

**Immunmodulerende  
polysakkarider isolert fra  
*Biophytum petersianum* Klotzsch**

**Etnofarmakologiske studier i Mali**



**Anne Sveaass  
Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.  
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi  
Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo  
2007**

**Immunmodulerende  
polysakkarider isolert fra  
*Biophytum petersianum* Klotzsch**

**Etnofarmakologiske studier i Mali**

**Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.  
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi  
Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo**

**Anne Sveaass  
Oslo, november 2007**

**Veiledere:**

**Professor Berit Smestad Paulsen**

**Professor Terje E. Michaelsen**

**Professor Drissa Diallo**

# Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, og Folkehelseinstituttet. I tillegg ble de etnofarmakologiske studiene gjort i Mali i perioden 10. mars-10. april.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min veileder, professor Berit Smestad Paulsen for god faglig og praktisk oppfølging i hovedfagsåret, samt for å være et hyggelig og verdifullt reisefølge i Mali.

Jeg vil også takke veileder, professor Terje E. Michaelsen for faglig oppfølging av arbeid utført på Folkehelseinstituttet.

Veileder, professor Drissa Diallo fortjener en takk for den vel gjennomførte jobben som tolk, intervjuer og reiseleder ved feltarbeidet i Mali.

Marit Inngjerdingen, Torun Aslaksen og Finn Tønnesen takkes for faglig og praktisk veiledning.

Berte Hedding, Ragnhild Kårvatn Evjenth og Ingvild Austarheim takkes for hyggelig reisefølge i Mali.

I tillegg vil jeg takke alle ansatte på Avdeling for Farmasøytisk Kjemi og Folkehelseinstituttet for praktisk hjelp og for å bidra til at dette har vært et læringsrikt og hyggelig hovedfagsår.

Oslo, november 2007

Anne Sveaass

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord .....</b>	<b>3</b>
<b>Innholdsfortegnelse .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Forkortelser .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Sammendrag .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Innledning .....</b>	<b>13</b>
3.1. Polysakkarider .....	13
3.1.1. Generelt .....	13
3.1.2. Pektiner .....	13
3.1.2.1. Arabinaner .....	16
3.1.2.2. Arabinogalaktan type I og II .....	16
3.1.2.3. Rhamnogalakturonan I .....	17
3.1.2.4. Rhamnogalakturonan II .....	18
3.1.2.5. Xylogalakturonan .....	19
3.1.3. Struktur og immunmodulerende aktivitet av pektiner .....	19
3.2. Immunmodulerende aktivitet .....	21
3.2.1. Introduksjon .....	21
3.2.2. Komplementsystemet .....	21
3.2.2.1. Generelt .....	21
3.2.2.2. Aktivisering av klassisk vei .....	22
3.2.2.3. Aktivisering av alternativ vei .....	23
3.2.2.4. Aktivisering av lektinvei .....	23
3.2.2.5. Dannelse av "Membrane Attack Complex" og fagocytose .....	24
3.2.2.6. Komplementaktivisering/komplementinhibering .....	24
3.2.3. Makrofager og makrofagaktivisering .....	26
3.3. Sårheling .....	28
3.4. Biophytum petersianum Klotzsch .....	29
3.4.1. Taksonomi .....	29
3.4.2. Botanikk .....	29
3.4.3. Tradisjonell bruk .....	30
3.4.4. Tidligere studier .....	31
<b>4. Oppgavens målsetning .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Materialer og metoder .....</b>	<b>33</b>
5.1. Generelle metoder .....	33
5.1.1. Vannkvalitet .....	33
5.1.2. Innveing .....	33
5.1.3. Sentrifugering .....	33
5.1.4. Filtrering .....	33
5.1.5. Avgassing og evakuering av luft .....	34
5.1.6. Volumreduksjon .....	34
5.1.7. Vask av dialyseslanger .....	34
5.1.8. Dialyse .....	35
5.1.9. Blanding av løsninger .....	36

5.1.10. Frysetørring .....	36
5.1.11. Syrevask av glassutstyr .....	37
5.1.12. pH-måling .....	37
5.1.13. Absorbansmåling .....	38
5.2. Isolering av polysakkarider .....	38
5.2.1. Diklormetaneekstraksjon .....	38
5.2.2. Metanolekstraksjon .....	39
5.2.3. Vanneekstraksjon .....	39
5.2.4. Gelfiltrering .....	41
5.2.4.1. Bio-Gel® P-2 Fine .....	41
5.2.4.2. PD-10 Desalting column .....	43
5.2.5. Ionebytterkromatografi .....	44
5.2.5.1. DEAE Sepharose® Fast Flow/ ANX Sepharose 4 Fast Flow .....	44
5.3. Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinnhold .....	48
5.3.1. Monosakkaridbestemmelse .....	48
5.3.1.1. Metanolyse .....	48
5.3.1.2. TMS-derivatisering .....	49
5.3.1.3. Gasskromatografi .....	50
5.3.2. Gelfiltrering koblet til FPLC-apparat .....	52
5.3.2.1. HiLoad™ 26/60 Superdex 200 prep grade .....	52
5.3.2.2. Superose 6 HR 10/300 pre packed GL .....	54
5.3.3. Fenolsvovelsyretest .....	56
5.4. Strukturoppklaring .....	57
5.4.1. Metylering .....	57
5.4.1.1. Karboksylsyre-reduksjon .....	57
5.4.1.2. Metylering .....	59
5.4.1.3. Hydrolyse .....	61
5.4.1.4. Reduksjon .....	62
5.4.1.5. Acetylering .....	63
5.4.1.6. GC-MS .....	64
5.4.2. Enzymatisk degradering .....	65
5.5. Immunmodulerende aktivitet .....	67
5.5.1. Tillaging av serum til komplementfikseringstest .....	67
5.5.2. Komplementfikseringstest .....	68
5.5.3. Preinkubering og ikke-preinkubering av testprøvene og komplementkilden ..	71
5.5.4. Måling av NO-frigjøring fra makrofager .....	72
<b>6. Resultater og diskusjon .....</b>	<b>75</b>
6.1. Sammenligningsgrunnlag .....	75
6.2. Isolering av polysakkarider .....	75
6.2.1. Ekstraksjon .....	75
6.2.2. Gelfiltrering ved bruk av Bio-Gel® P-2 Fine .....	76
6.2.3. Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow/ ANX Sepharose Fast Flow .....	77
6.2.4. Gelfiltrering med HiLoad™ 26/60 Superdex 200 prep grade .....	78
6.3. Karbohydratanalyse .....	80
6.3.1. Monosakkaridanalyse .....	80
6.3.2. Bindingsforhold .....	82
6.3.3. Molekylvektsdistribusjon .....	85
6.4. Immunmodulerende aktivitet .....	89

6.4.1.	Komplementfiksering .....	89
6.4.2.	Komplementfikseringstest ved bruk av humant serum fra et utvalg friske frivillige.....	91
6.4.3.	Preinkubering og ikke preinkubering av testprøvene og komplementkilden ..	93
6.4.4.	Makrofagstimulering.....	94
6.5.	Strukturoppklaring ved enzymatisk degradering og effekt på biologisk aktivitet .....	96
6.5.1.	Enzymatisk degradering.....	96
6.5.2.	Karbohydratsammensetning .....	96
6.5.3.	Bindingsforhold .....	98
6.5.4.	Molekylvektsdistribusjon.....	100
6.5.5.	Biologisk aktivitet på enzymatisk degradert materiale.....	101
<b>7.</b>	<b>Etnofarmakologiske studier i Mali.....</b>	<b>103</b>
7.1.	Etnofarmakologi .....	103
7.2.	Mali .....	103
7.3.	Tradisjonell medisin i Mali .....	104
7.3.1.	”Improved traditional medicines” .....	105
7.4.	Feltarbeid .....	107
7.4.1.	Healerintervjuer i Dioilaområdet .....	108
7.4.1.1.	N’Dia Dougountiguila .....	108
7.4.1.2.	Healerintervjuer i Beleco .....	109
7.4.1.3.	Healerintervjuer i N’Golobougou .....	111
7.4.1.4.	Healerintervjuer i Koutiala .....	113
7.4.1.5.	Forklaringer til tabellene.....	114
7.4.1.6.	Oppsummering av resultater fra healerintervjuer .....	114
<b>8.</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>Referanser.....</b>	<b>118</b>

# 1. Forkortelser

$\alpha$	Alfaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har samme konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
Ab	Antistoff
Ac	Acetyl
AcOA	eddiksyreanhydrid
AGI	Arabinogalaktan type I
AGII	Arabinogalaktan type II
AgNO <sub>3</sub>	Sølvnitrat
ANX	Dietylaminopropyl
APC	Antigenpresenterende celler
Ara	Arabinose
Ara <sub>f</sub> T	Terminal Arabinose på furanoseform
$\beta$	betaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har motsatt konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
B2IIc	Pektinfraksjon isolert fra <i>Bupleurum falcatum</i>
BP	Første fraksjon eluert ut på BioGel P-2 Fine
BPC50 og BPC100	Råekstrakt etter hhv. 50 °C og 100 °C vannekstraksjon
BPI, BPII og BPIII	Fraksjoner eluert fra ionebytterkolonnene DEAE/ANX Sepharose Fast Flow
BPII1, BPII2 og BPII3	Fraksjoner isolert fra BPII etter separasjon på gelfiltreringskolonnen Superdex 200
BPII1-I, BPII1-II, BPII1-III, BPII1-IV og BPII1-V	Fraksjoner isolert fra BPII1 etter videre separering på gelfiltreringskolonnen Superdex 200
BPII1-IIIE, BPII1-IIIE	Høymolekylære fraksjoner isolert etter separasjon på gelfiltreringskolonnen PD10 etter enzymatisk degradering fra BPII1-II og BPII1-III
BPII1-IIIE2, BPII1-IIIE2	Lavmolekylære fraksjoner isolert etter separasjon på gelfiltreringskolonnen PD10 etter enzymatisk degradering av BPII1-II og BPII1-III
BSA	Bovine Serum Albumine, bestanddel i Veronal/BSA-buffer
CMC	Carbodiimid
COOH	Syregruppe
CR	Komplementreseptor
COX	Cyclooxygenase
$\Delta$ IgG	Aggregert IgG
D	D-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
DCM	Diklormetan
DEAE	Dietylaminoetyl
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMT	Département de la Médecines Traditionnelles
<i>f</i>	Furanoseform, femring
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FI	Farmasøytisk Institutt
FID	flammeionisasjonsdetektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FS-test	Fenolsvovelsyretest
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose

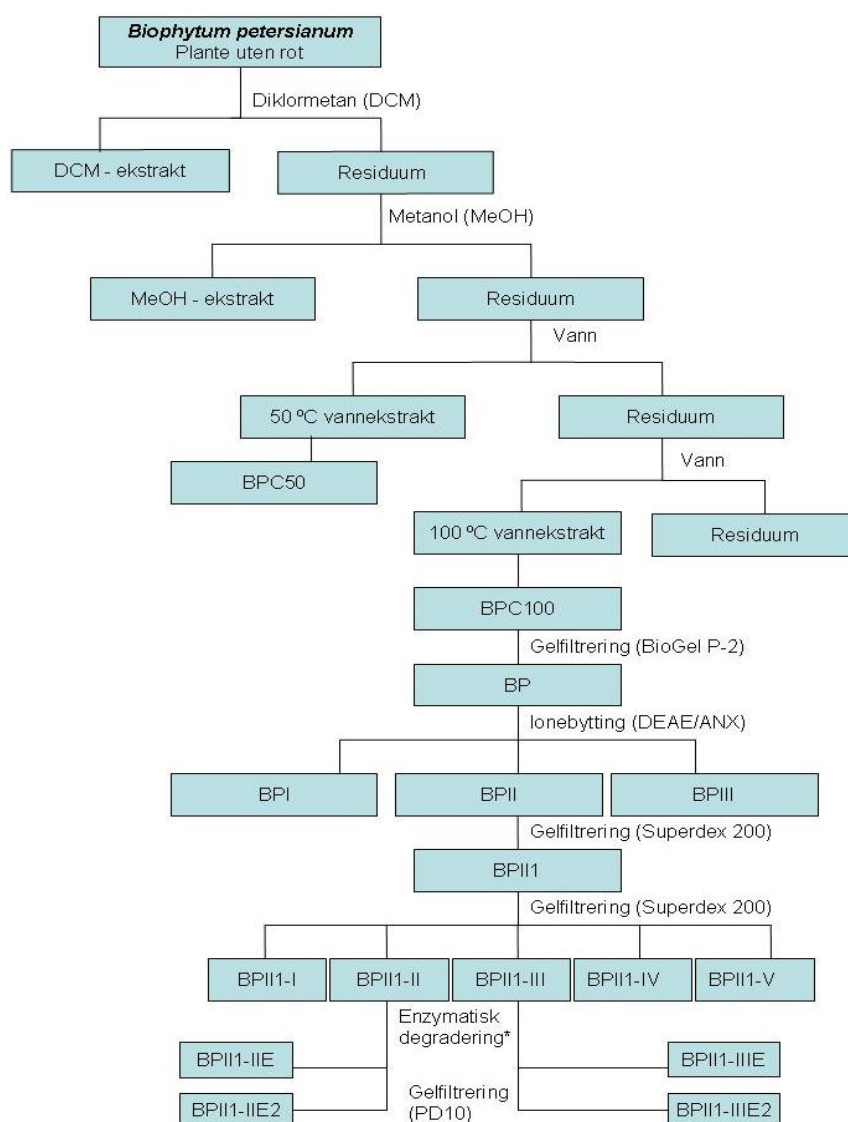
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC/MS	Gasskromatografi/massespektrometri
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
GM-CSF	Granulocytt makrofag koloni-stimulerende faktor
g-verdi	g-kraft ved sentrifugering
H <sub>2</sub>	Hydrogengass
HCl	Hydrogenklorid
HG	Homogalakturonan
HMDS	heksametyldisilazan
HMW	Høy molekylvekt
ICH <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50 % hemming
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INRSF	Institut National de Recherche en Santé Publique
ITM	Improved Traditional Medicine
kDa	Kilodalton
L	L-sukker med hydroksygruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
LMW	Lav molekylvekt
MAC	Membranangrepskompleks
Man	Mannose
MBL	Mannosebindende lektin
MCP-1	Monocytt Kjemotraktant Protein-1
Me	Metyl
MeOH	Metanol
Mn	Totalvekt av alle polymere i prøven dividert på antall polymere i prøven
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n.d.	Not detected
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
NaCl	Natriumklorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroksid
NED	N-(1-naptyl)etylendiamin
NO	Nitrogenoksid
O	oksygenatom
Oac	Oksygenatom bundet til sukker via oksygen
OAPI	The African Intellectual Property Organisation
OH	Hydroksylgruppe
<i>p</i>	Pyranoseform, seksring
PM II	<i>Plantago major</i> fraksjon II
RGI	Rhamnogalakturonan I
RGII	Rhamnogalakturonan II
Rha	Rhamnose
ROS	Reaktive oksygen species
rpm	Runder per minutt
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatographic analysis with Multi-Angle Laser Light Scattering Detection
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
TFA	Trifluoreddiksyre
TLR	Toll Lignende Reseptor



TMCS	Trimetylklorosilan
TMS	TCMS + HMDS + Pyridin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
UV	Ultraviolet
V <sub>0</sub>	Voidvolum, mobilfasens elueringsvolum i en kromatografisk kolonne
XG	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose
XylpT	Terminal Xylose på pyranoseform

## 2. Sammendrag

Tradisjonell medisin er en svært viktig del av helsetilbudet i Mali og mange andre land verden over. Healere har stor kunnskap om bruk av tradisjonell medisin som er tillært og overlevert gjennom generasjoner. *Biophytum petersianum* Klotzsch er tradisjonelt brukt mot blant annet malaria, feber og sårheling. Det er gode indikasjoner på at mange polysakkarider fra planter kan ha immunmodulerende effekt på mennesker. Screening-undersøkelser av *B. petersianum* har blant annet vist *in vitro* effekt på humant komplementsystem og videre studier av struktur-aktivitetsforhold er derfor interessant. Det henvises til Figur 2-1 for beskrivelse av prøveopparbeidelsen.



**Figur 2-1:** En forenklet oversikt over prøveopparbeidelsen.

\*BPII1-IIIE og BPII1-IIIE2 er henholdsvis høymolekylær og lavmolekylær fraksjon etter enzymatisk degradering med  $\alpha$ -arabinofuranosidase. BPII1-IIIE og BPII1-IIIE2 er hhv høymolekylær og lavmolekylær fraksjon etter degradering med  $\alpha$ -arabinofuranosidase og  $\beta$ -galaktosidase.

Monosakkaridsammensetning ble bestemt etter metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Molekylære bindingstyper ble analysert etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse. Molekylstørrelsen ble bestemt ved gelfiltrering koblet mot FPLC-apparatur. Aktivitet i biologiske systemer ble undersøkt ved komplementfikseringstest og måling av NO-utskillelse fra makrofager.

Analyse av karbohydratinnehold og bindingstyper hos BPII1-I, BPII1-II og BPII1-III viste innhold av rhamnogalakuronan I (RGI) og arabinogalaktan II (AGII) som ofte forekommer i komplekse og hårete områder. I tillegg er det høy forekomst av GalA som indikerer homogalakuronan (HG)-områder. Disse strukturene er ofte sett i sammenheng med immunmodulerende aktivitet og viser likhetstrekk med B2IIc, en sur fraksjon isolert fra *Bupleurum falcatum* (Paulsen og Barsett, 2005). Fraksjonenes innhold av xylogalakuronanområder (XG), er et mindre typisk trekk. Enzymatisk degradert BPII1-II resulterte i en fraksjon (BPII1-IIIE) med færre Ara/T. Enzymatisk degradering av BPII1-III ga en fraksjon (BPII1-IIIE) uten Ara/T, uten Gal og med redusert mengde Rha, som trolig medfører færre AGII- og RGI-områder. Høyt innhold av terminale bindinger kan bety høy grad av forgrening i pektinstrukturene. BPII1-I hadde høyest forgreningsgrad, noe som kan forklare at BPII1-I hadde høyest aktivitet på komplementsystemet.

Molekylstørrelsen ble bestemt på gelfiltreringskolonnen Superose 6 og beregnet ut ifra kalibrert standardkurve. BPII1-I, BPII1-II og BPII1-III eluerte alle ut med "void volume", eksklusjonsvolumet ( $V_0$ ), trolig pga karbohydrataggregering. Fraksjonene BPII1-IIIE og BPII1-IIIE eluerte også ut med  $V_0$ , sannsynligvis av samme grunn.

Fem av syv fraksjoner viste langt høyere aktivitet enn PM II i komplementfikseringstesten. Av prøvesubstansene viste BPII1-I høyest aktivitet, med 16 ganger høyere aktivitet enn PM II-standard benyttet. De to fraksjonene som ikke var like aktive inneholdt trolig forurensninger. BPII1-IIIE ga tilsvarende aktivitet som BPII1-II, mens BPII1-IIIE hadde en redusert aktivitet.

BPII1-I's aktivitet på komplementsystemet,  $ICH_{50}$ -verdien (konsentrasjonen av prøven som gir 50% hemming i testsystemet), varierte fra 4,7  $\mu\text{g/ml}$  til 950  $\mu\text{g/ml}$  avhengig av hvilken person komplementserumet benyttet i testen kom fra. Dette er tidligere sett for PM II ved bruk av de samme sera (Michaelsen *et al.*, 2000), men ved begge anledninger viser den positive kontrollen aggregert IgG ( $\Delta\text{IgG}$ ) nesten konstant  $ICH_{50}$ -verdi.

Reaksjonsmekanismene som ligger bak er ikke kjent, men det er rimelig å anta at BPII1-I interagerer annerledes med komplementsystemet enn  $\Delta$ IgG. Undersøkelse på om BPII1-Is komplementfikserende aktivitet kan tilskrives komplementaktivering eller komplementinhibering viste at BPII1-I trolig har en komplementaktiverende aktivitet.

Alle fraksjonene unntatt BPII1-IV og BPII1-V viste en økt utskillelse av NO fra makrofager. Responsen var doseavhengig og kan tyde på makrofagstimulerende egenskaper.

55 healere i Dioila- og Koutiala-området ble intervjuet med hensyn til medisinsk bruk av *B. petersianum*. Tilsammen 49 av healerne brukte planten i sin praksis. Dekokt av plante uten rot ble brukt mot malaria, hemorroider og dystussi. 17 av 49 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. Av tilsammen 24 indikasjoner var malaria, sår, og dystussi hyppigst nevnt. Plante uten rot var hyppigst i bruk, og da særlig som et dekokt.

## 3. Innledning

### 3.1. *Polysakkarider*

#### 3.1.1. Generelt

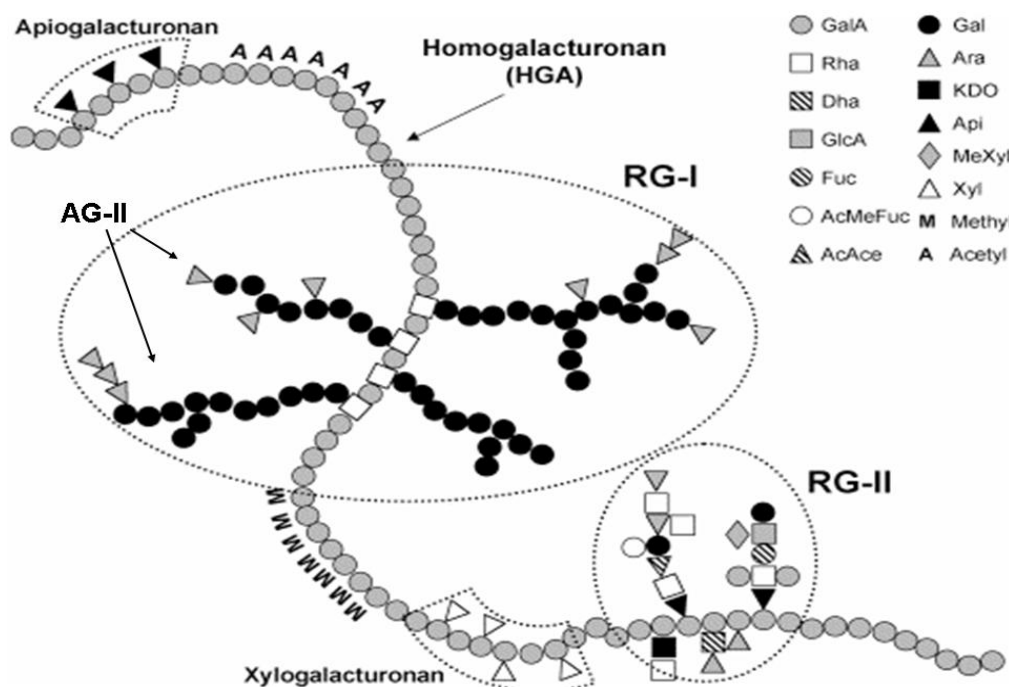
Karbohydrater er en samlebetegnelse på monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider, samt derivater fra disse. Polysakkarider (glykaner) er makromolekyler bestående av 10 monosakkarider eller mer og er bundet sammen med glykosidbindinger. Homogene polysakkarider består av like monosakkarider. Forskjellige monosakkarider gjør strukturen heterogen eller kompleks. Polysakkaridenes strukturelle og biologiske egenskaper avhenger av monosakkaridsammensetning og hvordan de er bundet sammen. Polysakkarider forekommer derfor mange steder og finnes som celleveggsubstans i planter, insekter og skalldyr, bærere av biologisk aktivitet og annen informasjon i cellene, men også som kostfiber med gunstig effekt på mage og tarm (Bruneton, 1995 og Paulsen, 2005).

Polysakkarider er strukturelt sett en svært sammensatt gruppe som enten kan ha en nøytral eller negativ ladning. Biologisk aktive polysakkarider er i mange tilfeller ladede fordi de kan inneholde uronsyrer. Flere typer polysakkarider isolert fra planter har i studier vist en modulerende effekt på immunsystemet, deriblant komplementsystemet. Dette kan føre til påvirkning av lymfocytproliferasjon, antistoffproduksjon, makrofagfunksjon og immunforsvaret i mage/tarm-systemet (Yamada og Kiyohara, 2007). Eksempler på pektinske polysakkarider er arabinaner, arabinogalaktaner, AG, og rhamnogalakturonaner, RG (Paulsen og Barsett, 2005).

#### 3.1.2. Pektiner

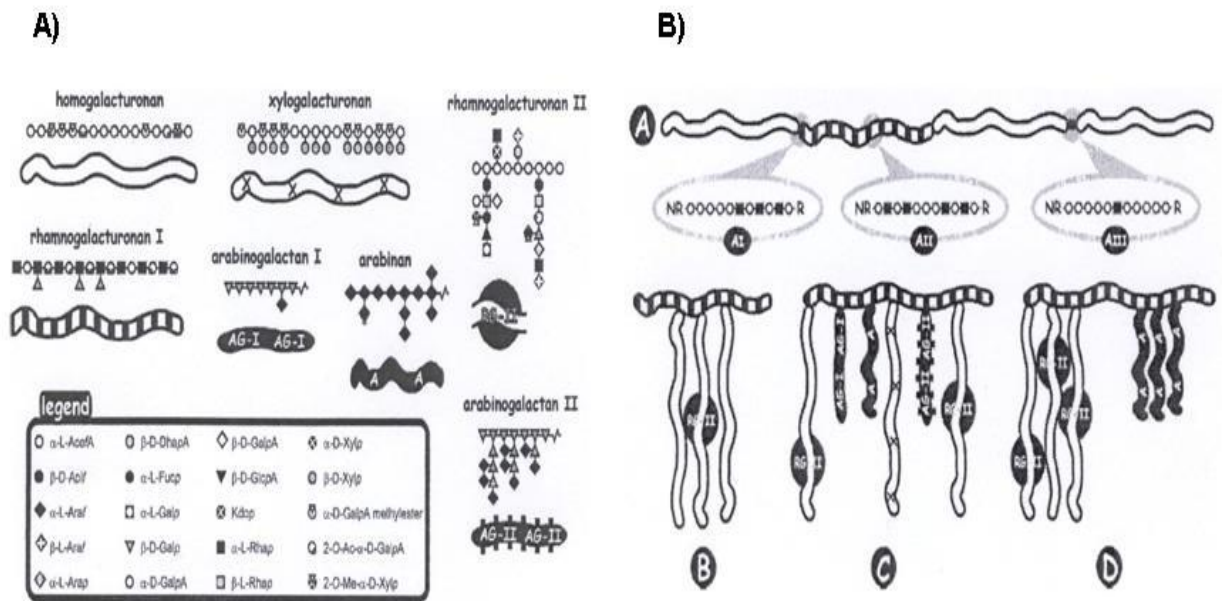
Pektiner er strukturelt viktige og sannsynligvis de mest komplekse av alle celleveggpolysakkarider. Deres molekylstørrelse ligger i størrelsesorden 100 kDa. De er sure og inneholder store mengder D-galakturonsyre (GalA). Pektin består trolig av en hovedkjede med glatte galakturonanregioner av  $\alpha$ -1,4-D-GalA. De glatte områdene er stedvis avbrutt av forgrenede RG-områder, dvs hårete regioner. Her vil hovedkjeden i stedet være bygget opp av alternerende  $\alpha$ -1,2-L-rhamnose (Rha) og  $\alpha$ -1,4-D-

galaktoseresiduer (Gal), også beskrevet som RGI. Det vil som regel være bundet sidekjeder til opptil fire av Rha-residuene. Andelen glatte og hårete områder på pektinet varierer i stor grad avhengig av vevstype og plantens modning. De viktigste pektinforbindelsene er rhamnogalakturonan I og II (RGI og RGII), arabinaner, galaktaner, xylogalakturonaner (XG) og arabinogalaktaner type I og II (AGI og AGII), se Figur 3-1 (Voragen *et al.*, 2000).



**Figur 3-1:** Foreslått skjematisk struktur av pektin (Pérez *et al.* 2003). Sidekjeder på RGI er eksempler på AGII og hvordan de kan sitte på RGI.

Pektinets egenskaper bestemmes trolig av GalA-innholdet, oppbygging med nøytrale sukre, mengde og fordeling av metylestere, samt acetylgrupper og molekylstørrelse. I tillegg vil forholdet mellom glatte og hårete områder, substansens lengde og strukturen på de nøytrale sidekjedene også kunne virke inn (Voragen *et al.*, 2000). Figur 3-1 og 3-2 viser to forslag til oppbygging av pektinstrukturer. Figur 3-1 viser homogalakturonan (HG) som en hovedkjede der RGI og RGII med tilbundet AGI, AGII og arabinaner er bundet til som sidekjeder. Figur 3-2 presenterer pektiner der hovekjeden består av HG og RGI, som begge kan sitte i hovekjeden men også som sidekjede. Andre sidekjeder er XG, AGI og AGII. Tanken om at HG både finnes som hovedkjede og sidekjede gir muligheter for større forgreninger i molekylet.



**Figur 3-2:** Figur A illustrerer en skjematisk presentasjon av pektinets bestanddeler. Figur B viser en foreslått struktur av pektin. Hovedkjeden består av HG og RGI, mens de hårete områdene består av strukturer vist i A (Vincken *et al.*, 2003).

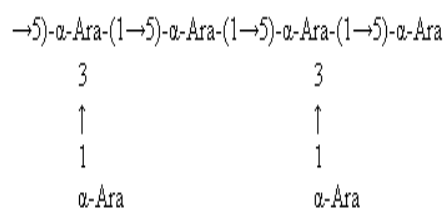
I alle planter er celleveggen en fysisk barriere mot angrep av patogener, men studier viser at polysakkaridene i celleveggen også spiller en mer aktiv rolle i forsvaret.

Celleveggdegraderende enzymer fra mikroorganismer vil frigjøre oligosakkarider som kan signalisere en initiering av forsvarsmekanismer til naboplanteceller. De best dokumenterte av oligosakkaridene er korte sekvenser av  $\alpha$ -1,4-bundne D-GalA residuer (Reid, 1997).

HG kan danne geler ved tilstedeværelse av  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner (Willats *et al.*, 2001). Dette skjer ved en interaksjon mellom de negativt ladede HG-områdenes forgreningspunkter og de divalente positive ionene (Reid, 1997). I tillegg vil strukturelle karakteristika som kjedekonformasjoner og intermolekylære krefter være med på å bestemme polysakkaridets egenskaper. Antall hydrogenbindinger innad i strukturen og hydroksylgrupper vil f.eks påvirke hydrofilisiteten. Polysakkarider på furanoseform er mer bevegelige enn på pyranoseform og dette vil påvirke strukturens viskositet i kontakt med vann (Florence og Atwood, 1998).

### 3.1.2.1. Arabinaner

Arabinaner funnet i planter består hovedsakelig av L-arabinofuranosider og er lineære eller forgrenede avhengig av opphavet. Arabinanene er ofte hektet sammen i  $\alpha$  1,5-posisjon, og forgrenede strukturer blir til ved binding i  $\alpha$  1,2 eller  $\alpha$  1, 3. Trolig foreligger ikke arabinaner fritt i naturen, men er bundet til galaktanene i pektinske komplekser. Ekstraksjonsprosesser kan medføre at arabinanene spaltes av ved enzymatisk eller sur hydrolyse. Enzymatisk hydrolyse mistenkes siden cellevegger der arabinaner forekommer ofte er rike på både ekso- og endoglykanaser (Paulsen og Barsett, 2005).



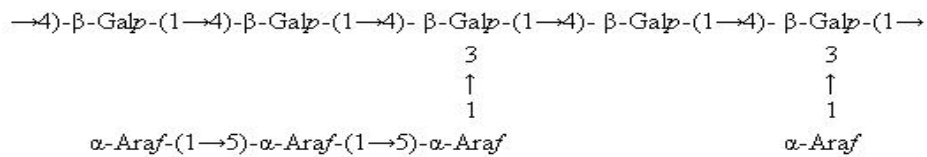
**Figur 3-3:** Foreslått struktur av del av arabinan (Paulsen og Barsett, 2005)

### 3.1.2.2. Arabinogalaktan type I og II

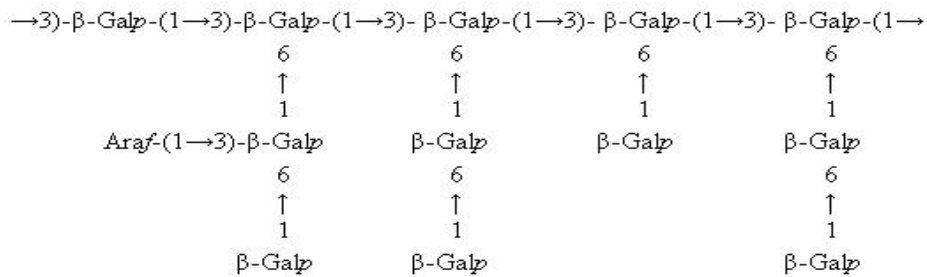
Arabinogalaktanene kan inndeles i 3 klasser; arabino-4-galaktaner (type I), arabino-3,6-galaktaner (type II), og polysakkarider med sidekjerder av arabinogalaktan (type III). Sistnevnte kalles ofte ekte pektin. AGI finnes i varierende grad i celleveggen og er bygget opp av en  $\beta$ -1,4 hovedkjede av galaktan. Arabinaner er bundet 1,3 til galaktose (Gal). Figur 3-4 viser foreslått struktur av AGI og AGII.



**A: Arabinogalaktan type I (AG I)**



**B: Arabinogalaktan type II (AG II)**



**Figur 3-4:** *Arabinogalaktan type I (A) og arabinogalaktan type II(B) (Stephen, 1982 og Taiz og Zeiger, 1998)*

AGII har en hovedkjede av galaktan som har både 1,3- og 1,6- som forgreningspunkter, og dette gjør AGII til svært forgrenede strukturer. Både AGI og AGII er vanlig å finne som bestanddeler i RGI. Det er funnet at begge AG-variantene er heftet til Rha på RGI i 1,4-binding. Man kan enkelt skille mellom AGI og AGII med Yariv-testen, der bare AGII danner et rødt bunnfall med Yarivs reagens. Testen brukes ofte for å vise tilstedeværelsen av AGII i bioaktive polymere, men kan også benyttes kvantitativt (Paulsen og Barsett, 2005).

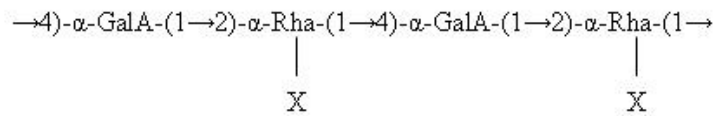
AGII har flere immunmodulerende egenskaper og er forslått å være en av de viktigste immunmodulerende substansene i planteriket (Yamada og Kiyohara, 2007).

### 3.1.2.3. Rhamnogalakturonan I

Rhamnogalakturenan I (RGI) består av en hovedkjede alternerende av  $\alpha$ -1,2-bundne L-Rha og  $\alpha$ -1,4-bundne D-GalA-enheter. Rha-enhetene er å finne som forgreningspunkter. Sidekjeder hektes på GalA, og består av Ara og Gal i varierende strukturer, oftest er det arabinaner og arabinogalaktaner i form av AGII, men AGI kan

også forekomme. Dette området på pektinet betegnes ofte som de hårete eller ramnifiserte områdene (Paulsen og Barsett, 2005).

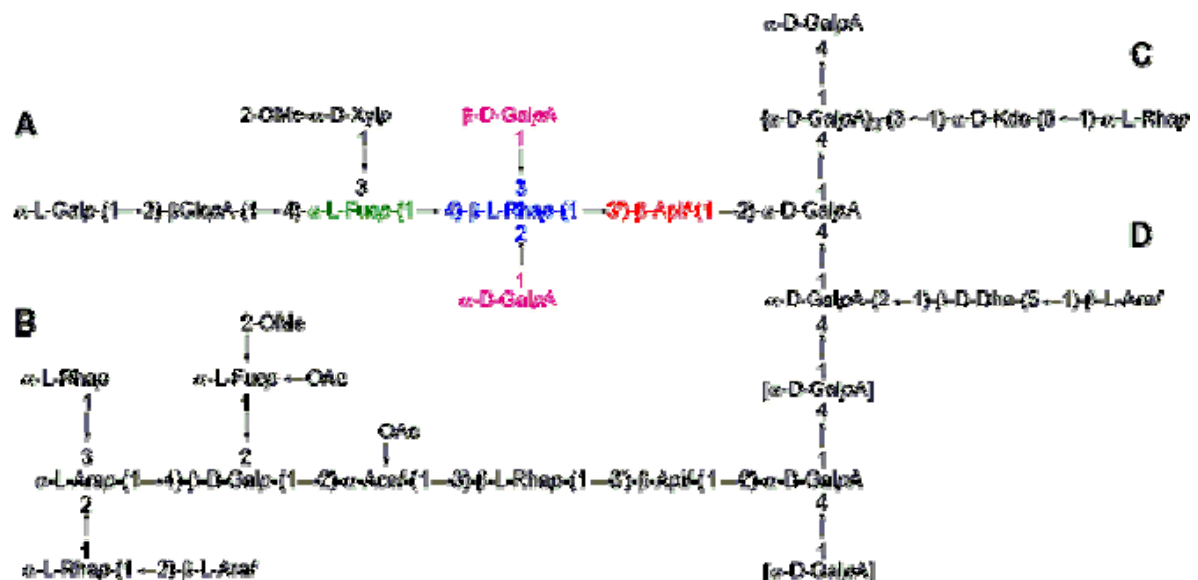
### Rhamnogalakturonan I



**Figur 3-5:** Hårete område av RGI. Sidekjedene, X, består ofte av AGII (Taiz og Zeiger, 1998).

### 3.1.2.4. Rhamnogalakturonan II

Rhamnogalakturonan II (RGII) utgjør en liten del av totalmengde pektin. Hovedkjeden er hovedsakelig bygget opp av HG bestående av ca 10  $\alpha$ -1,4-bundne D-GalA-enheter med fire forskjellige sidekjedener bundet til 1,3 eller 1,4 på GalA i hovedkjeden. Sidekjedene er langt mer kompliserte enn i RGI, og i tillegg til Ara og Gal består de av mer uvanlige sukkerenheter som apiose, 2-O-metylfukose og fukose (Paulsen og Barsett, 2005). Polymeren er så kompleks at den antas å ha en rolle i cellegjenkjenning- og celleoverføringsmekanismen (Reid, 1997).



**Figur 3-6:** Foreslått fremstilling av RGII. Her vises en hovedkjede av HG med fire oligosakkaridkjedener betegnet A-D (University of East Anglia, 2006)

### 3.1.2.5. Xylogalakturonan

Xylogalakturonan (XG) består av en hovedkjede av HG der xylose (Xyl) er bundet 1,3 til GalA (Figur 3-2 og Willats *et al.* 2001). Det har blitt foreslått at XG ikke er en integrert del av den pektinske hovedkjeden, men tilstede som en sidekjede på RGI. Hvis så er tilfelle vil XG utgjøre en del av de hårete områdene (Vincken *et al.* 2003).

### 3.1.3. Struktur og immunmodulerende aktivitet av pektiner

De siste 20 årene har det vært en økende interesse for polymere polysakkariders immunmodulerende aktivitet. Utvikling av nye metoder har gitt økt kunnskap om hvilke strukturer som er viktige for aktivitet. (Paulsen og Barsett, 2005).

Ikke alle bestemte pektiske polymere beskrevet i avsnittene ovenfor viser nødvendigvis bioaktivitet. Bioaktivitet er avhengig av at det er bestemte strukturer tilstede. Mye tyder på at det må være mer enn et enkelt aktivt sete for alle de funksjoner som pektinene kan ha (Paulsen og Barsett, 2005).

Hårete områder av pektiner synes viktige for komplementaktivering, de har vist aktivitet etter avspaltning fra glatte områder. Hårete områder fra RG har vist seg å aktivere både den klassiske og den alternative veien i komplementsystemet. I tillegg til de hårete områdene kan det tyde på at HG-områdene har evne til å påvirke komplementsystemet (Hokputsa *et al.* 2004, Nergård *et al.* 2005, Yamada og Kiyohara, 1999). Hovedkjeder med RGI og hårete sidekjeder bestående av AGII har vist en potent aktivitet i biologiske testsystemer (Figur 3-1 og Inngjerdingen, 2007).  $\beta$ -1,3-galaktan med 1,6-galaktooligosakkaridsidekjeder synes å være et minimum for biologisk aktivitet for AG. I tillegg er nøytrale sidekjeder trolig også viktig. Både metylforestring og forgrening i galakturonanområder nedregulerer aktiviteten av de hårete områder. Dette kan tyde på at tredimensjonal struktur og molekylvekt kan påvirke komplementaktiveringen (Kiyohara *et al.* 1997, Nergård *et al.* 2006, Yamada og Kiyohara, 1999). Yamada *et al.* (1986) beskrev også at *O*-acetylte polysakkarider kan påvirke evnen til å aktivere det klassiske komplementsystemet, mens karboksylsyrer ansees som essensielt for alternativ aktivisering.

Pektin i *Bupleurum falcatum* har blitt nøye studert ettersom de har vist aktivitet i komplementsystemet, anti-ulcer effekt og en oppregulerende effekt som øker antall Fc-reseptorer på makrofager og gir større eliminasjon av immunkomplekser fra sirkulasjonen. Den mest potente fraksjonen var Bupleuran 2IIc som i tillegg viste en potent mitogen effekt mot miltceller fra mus og celler fra Peyers patch fra tynntarmen, *in vitro*. Detaljerte strukturelle studier har vist at polysakkaridets hårete områder og store områder med GalA inneholder bioaktive komponenter, og her var strukturer som  $\beta$ -D-4-O-metylGlcA- eller  $\beta$ -D-GlcA-1,6- $\beta$ -Dgalp- $\beta$ -D-1,6- $\beta$ -D-Galp mulige gjenkjennelsestrukturer for gjenkjenning av karbohydratreseptorer på B-celler. Siden har man vist lignende strukturer i medisinsplanter brukt mot sår (Paulsen og Barsett, 2005).

Noen tredimensjonale konfigurasjoner synes viktige for immunmodulerende aktivitet. Flere studier konkluderer med at polysakkaridenes molekylstørrelse spiller inn. Et minimum av molekylstørrelse er en forutsetning for aktivitet, og dette kommer trolig av at større og mer forgrenede molekyler har konformasjoner som gir flere bindingssteder på molekylet (Nergård, 2005). Det er foreslått at epitoper blir bedre uttrykt i store polysakkarider enn små, og at de store polysakkaridene kan inneholde mer enn ett bindingssete som kan øke aktiviteten til molekylet (Paoletti *et al.*, 1992 og von Hunolstein *et al.*, 2003).

Det er rapportert om en mulig sammenheng mellom høy komplementfikserende aktivitet og høy mitogen B-celleaktivitet. For begge de biologiske mekanismene kan det være en forutsetning om at en minstemengde RGI med nøytrale sidekjerder forekommer (Nergård, 2005).

Selv om det har blitt isolert flere forskjellige antikomplementære polysakkarider fra bakterier, sopp og planter er det fortsatt begrenset viten om struktur-aktivitetsforholdene (Yamada *et al.*, 1986).

## 3.2. Immunmodulerende aktivitet

### 3.2.1. Introduksjon

Immunsystemet er livsviktig for mennesker. Når kroppen blir angrepet av mikroorganismer vil det medfødte immunsystemet være det første som trer i funksjon. Deretter kommer det adaptive immunsystemet på banen dersom de medfødte immunmekanismene ikke greier å forsvare kroppen godt nok. I den vestlige verden har vår livsstil og tilgang på vaksiner medført at kroppen i mindre grad blir utfordret av potensielle patogene mikroorganismer. Dette er sannsynligvis en medvirkende årsak til en stigende forekomst av allergi og autoimmune sykdommer som er et resultat av ubalanse i immunsystemet (Parham, 2005).

Polysakkarider som pektiner, pektiske polysakkarider og hemicellulose-polysakkarider har vist en rekke viktige farmakologiske aktiviteter. Plantepolysakkarider ser ut til å kunne modulere immunsystemet ved å f.eks påvirke komplementsystemet, lymfocytproliferasjonen, produksjon av antistoffer, makrofagfunksjon og immunitet i tarmsystemet (Yamada og Kiyohara, 2007).

### 3.2.2. Komplementsystemet

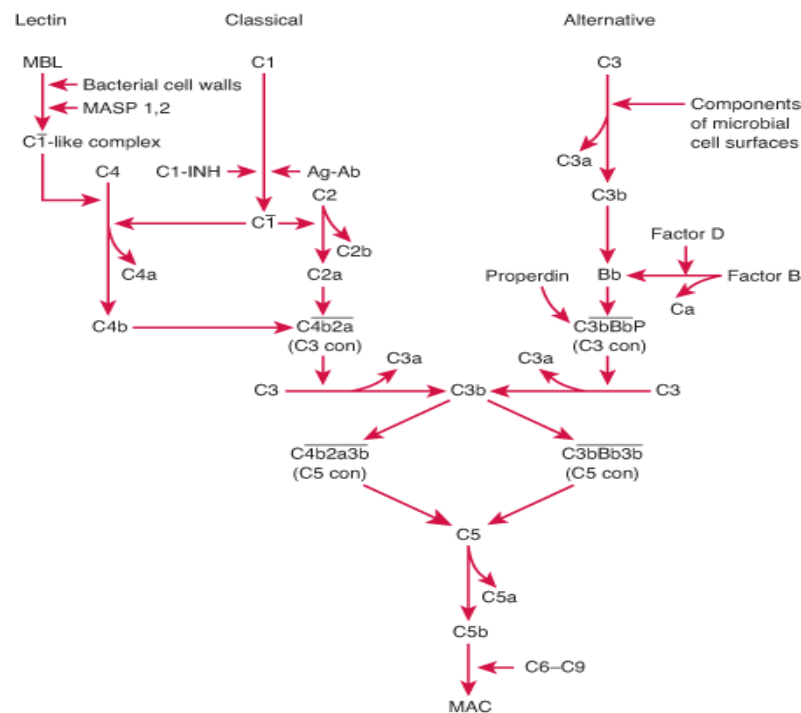
#### 3.2.2.1. Generelt

En metode for å bestemme den immunologiske aktiviteten til plantepektiner på er ved å måle effekten de utøver på komplementsystemet. Komplementsystemet består av en rekke enzymer som er tilstede i blodet i en inaktiv form. Det er en del av det medfødte immunforsvaret, men deltar også i samarbeid med det adaptive immunsystemet (Parham, 2005).

Komplementsystemet kan aktiveres via tre forskjellige kaskader (Figur 3-7):

- Klassisk vei
- Alternativ vei
- Mannosebindende lektinvei (MBL-vei)

Alternativ- og MBL- komplementaktiveringsvei utgjør en del av de tidlige medfødte forsvarsmekanisme (Yamada og Kiyohara, 2007). De tre komplementkaskadene skiller seg fra hverandre i måten de aktiveres på og de første reaksjonene som skjer, men samles igjen ved spalting av C3 til C3a og C3b, og kovalent binding av C3b til patogenets overflate. Slik merker C3b patogenet for destruksjon. Dette kan forekomme direkte vha fagocytose, men C3b fungerer også som aktivator av den videre komplementkaskaden som vil medføre perforering av patogenets cellevegg (Parham, 2005).



Figur 3-7: Komplementsystemet kan aktiveres via tre veier (Merck, 2007).

### 3.2.2.2. Aktivering av klassisk vei

Den klassiske komplementvei initieres av at C1 binder seg til Fc-regionen på et antistoff som er en del av et antistoff:antigen (Ab:Ag) kompleks. C1q-delen av C1-komplekset gjenkjenner spesifikt Fc-regionen og binder seg til denne. Antistoff (Ab) er enten IgG eller IgM. Ved binding til C1q og påfølgende konformasjonsendring blir proteasene C1r og C1s aktivert. C1s vil så aktivere C4 og C2. C2 og C4-fragmenter assosieres så på patogenets overflate for å danne en klassisk C3 konvertase; C4b2a. Denne vil aktivere C3 ved at den spaltes til fragmentene C3a og C3b. C3b festet til patogenoverflaten genererer en dannelse av alternativ C3 konvertase; C3bBb. Denne aktiveres også i alternativ vei. Aktivert faktor B tilsvarer C2 og alternativ C3 konvertase akselererer enzymreaksjonen (Parham, 2005).

I tillegg til at klassisk aktiveringsvei initieres av Ab bundet til patogener som G<sup>-</sup>-bakterier og virus, initieres den også av C-reaktivt protein, og serum amyloid protein (Alban *et al.*, 2002, Guo og Ward, 2005 og Yamada og Kiyohara, 2007).

### 3.2.2.3. Aktivering av alternativ vei

Aktivering av den alternative komplementvei er noe av det første som skjer når et patogen penetrerer epitelbarrierer og de medfødte mekanismene bringes på banen. Hydrolyse av C3 skjer kontinuerlig i systemet av H<sub>2</sub>O, men med lav hastighet (Parham, 2005). Hydrolysehastigheten vil akseleres i nærheten av hele mikroorganismer og deres produkter som LPS, zymosan (cellevegg fra sopp), peptider, teichoinsyre, inulin og enkelte celleoverflater som inneholder karbohydrater og lipider (Guo og Ward, 2005 og Yamada og Kiyohara, 1999). Produktet av den spontane hydrolysen, C3b, binder seg til faktor B i blodet. Dette gir en løselig variant av C3 konvertase. Noe av det C3b som dannes vil bindes til patogenets overflate. Faktor B aktiveres av faktor D og bindes til C3b fragmentene. C3-konvertasen for alternativ vei, C3bBb, er så aktivert. Konvertasen på patogenets overflate utfører så en progressiv amplifisering som raskt kan dekke dens overflate med C3b. Jo tettere de sitter desto mer effektivt fungerer dette som en ligand for komplementreseptorer som CR1 på makrofager som er tilstede i det infiserte vevet. Komplementaktiveringen kan fortsette og C5 konvertase dannes (Parham, 2005).

### 3.2.2.4. Aktivering av lektinvei

Lektinaktiveringsveien er ikke antistoffavhengig, men benytter seg av deler av den klassiske aktiveringsveien. Akuttfasereaktanten, mannosebindende lektin (MBL), kan binde seg til Man på overflaten av mikroorganismer og dermed aktivere mannosebindende lektin-serinprotease (MASP-1, -2 og -3) som er analoge til C1r/C1s proteasene. De går så inn og aktiverer komplementproteinene i den klassiske aktiveringsveien ved dannelse av klassisk C3 og C5 konvertase (Guo og Ward, 2005).

### 3.2.2.5. Dannelse av "Membrane Attack Complex" og fagocytose

C3b er nå aktivert av de tre kaskadeveiene, og bundet til patogenoverflater og løselige patogener. Det som så skjer er at de terminale komplementkomponentene gir lyse (sprekking) av patogener ved å danne membranporer. C3b binder seg til C3-konvertase og aktiverer C5 ved å lage C5-konvertase. Den klassiske C5-konvertasen består av C4b, C2a og C3b, mens den alternative C5-konvertasen består av Bb og to C3b komponenter; C3b2Bb. C5 klippes til C5a og C5b. C5b initierer dannelsen av et "Membrane Attack Complex" (MAC) som kan lage hull i membranen på både prokaryote og eukaryote celler. C6 og C7 bindes deretter til C5b. Denne interaksjonen eksponerer den hydrofobiske siden til C7 som settes inn i dobbeltlipidlaget. Det samme skjer når C8 bindes til C5b. Delen av C8 som sitter i membranen polymeriserer så C9, komponenten som danner selve den transmembrane poren (Parham, 2005).

Fragmentene C3b og C4b på patogenoverflaten gjenkjennes av komplementreseptorer på ulike celletyper. Komplementreseptorer kan deles inn i 2 grupper; CR1 og CR2 befinner seg i en gruppe mens CR3 og CR4 er i den andre. De fire reseptorene varierer med tanke på den cellulære distribusjonen. Makrofager og nøytrofiler uttrykker CR1, som ved binding til C3b eller C4b vil gjøre opptak og destruksjon av patogener enklere. CR2 (kalles også CD21) uttrykkes på B-celler og follikulære dendritiske celler. Når B-cellen bindes til antigen, vil signalet forsterkes hvis B-cellereseptor (BCR) i tillegg interagerer med et komplementfragment, C3b, på patogenoverflaten. CR3 og CR4 er  $\beta$ -integriner som binder seg til C3b på patogenoverflater. De uttrykkes på fagocytter hvor samarbeid med Fc-reseptorene øker fagocytosen. Men binding til CR3 er i seg selv også nok til å resultere i fagocytose. Komplementreseptorer fjerner med dette immunkomplekser fra sirkulasjonen (Parham, 2005).

### 3.2.2.6. Komplementaktivering/komplementinhibering

Komplementaktivatorer og komplementinhibitorer har begge en komplementfikserende aktivitet. Ved komplementaktivering vil resultatet bli nedsatt hemolyse i et indikatorsystem som følge av en redusert mengde tilgjengelig komplement. Komplementet har blitt aktivert og dermed også forbrukt. Komplementinhibering vil også



gi redusert hemolyse i indikatorsystemet fordi en komplementinhibitor vil hemme enkelte trinn i kaskaden. Av den grunn vil den antikomplementære effekten man ser i hemolytiske forsøk kunne være et resultat av både komplementaktivering og inhibering uten at det er mulig å skille mekanismene fra hverandre (Yamada og Kiyohara, 2007).

Ved komplementaktivering genereres det biologisk aktive komplementfragmenter som C3a og C5a. Disse peptidmediatorene utfører en rekke biologiske aktiviteter som økt lokal vaskulær permeabilitet, kjemotaktisk tiltrekning av leukocytter, immunadherens og modulering av antistoffproduksjon. Av den grunn bidrar en komplementaktivering til inflammatoriske responser i tillegg til forsvarsmekanismene (Yamada og Kiyohara, 2007).

Komplementaktivering er en del av patogenesen ved mange inflammatoriske og immunologiske sykdommer, som sepsis, akutt respiratorisk stress syndrom, reumatoid artritt, glomerulonefritt, multippel sklerose, iskemiske reperfusjonsskader, og astma (Guo og Ward, 2005). Pga dette bidrar en komplementaktivering til inflammatoriske responser i tillegg til vertens allerede tilstedeværende responser (Yamada og Kiyohara, 2007). Selv om ikke aktivering av C3a og C5a nødvendigvis er utløsende årsak til inflammatoriske sykdommer, ser de ut til å være ansvarlig for å fremme og forverre inflammatoriske reaksjoner (Guo og Ward, 2005).

Siden en aktivering av komplementsystemet vil bidra til inflammatoriske responser og immunologiske forsvarsreaksjoner, vil et forbruk av komplement vha polysakkarider kunne være en god terapeutisk strategi for behandling av inflammatoriske sykdommer (Inngjerdingen, 2007). Ved komplementinhibering hemmes enkelte skritt i komplementkaskaden, og det kan også være fordelaktig ved enkelte sykdomstilstander. Aktivering av komplementsystemet vil bidra til vertens forsvar mot patogene mikroorganismer og stimulere sårheling. I tillegg kan det ha en antitumoraktivitet. Inhibering av komplementsystemet kan f.eks være fordelaktig ved organtransplantasjon for å redusere vevsskade og reduksjon av reperfusjonsskade ved iskemi (Alban *et al.*, 2002).

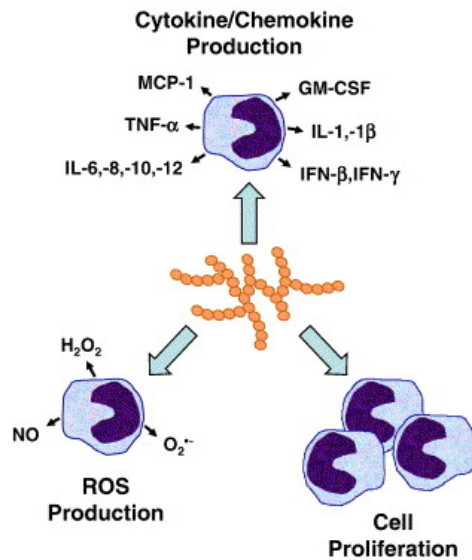
De fleste antikomplementære polysakkarider som er isolert fra varmtvannsekstrakter av forskjellige medisinsplanter har vist en komplementaktiverende og ikke komplementinhiberende effekt (Yamada og Kiyohara, 2007). *Plantago major* L. er et

eksempel på dette, og aktiviteten utøves både på den klassiske og den alternative aktiveringsveien. Pektinet PM II som er isolert fra planten inneholder områder med HG, RGI og RGII (Michaelsen *et al.*, 2000).

### 3.2.3. Makrofager og makrofagaktivering

Makrofager er spesialiserte hvite blodceller som finnes i store mengder i vev og lymfeknuter og utgjør en viktig del av det medfødte immunforsvar. De sirkulerer som monocytter i blodstrømmen før de slår seg ned i vev og modnes til makrofager. De klassifiseres som fagocytter, hvis hovedoppgave er å ta opp i seg og ødelegge patogener. Makrofager er store celler festet på vevsoverflater som, i tillegg til å fagocyttere, bidrar til det spesifikke immunforsvaret ved blant annet å fungere som antigenpresenterende celler (APC). På deres overflate uttrykkes reseptorer som gjenkjenner karbohydrater og andre komponenter som finnes på mikrobers overflate. Treffer makrofagen på et slikt patogen, signaliseres det en økt MHC-ekspresjon. De blir da profesjonelle APC. T-hjelpecelle type 1 ( $T_H1$ -celle) aktiveres ved å interagere med antigen presentert på makrofagens overflate. Dette fører til frigjøring av cytokiner som bl.a. stimulerer makrofager til økt fagocytose og fremmer inflammatorisk respons (Parham, 2005). Makrofager er i tillegg involvert i prosesser som vevsremodellering, sårtilheling og hematopoese (Schepetkin og Quinn, 2006).

Flere studier har gjennom årene vist at forbindelser fra bakterier og encellede sopparter kan ha potente makrofagmodulerende egenskaper (Tzianabos, 2000). Interessen for å undersøke tilsvarende effekter fra planter har økt mye de siste årene og en rekke plantederiverte polysakkarider har vist å ha positive farmakologiske effekter relatert til modulering av makrofagfunksjon. Blant effektene kan nevnes cytokinfrigjøring, dannelse av reaktive oksygenspecies (ROS) og økt makrofagproliferasjon (Figur 3-8, Schepetkin og Quinn, 2006).

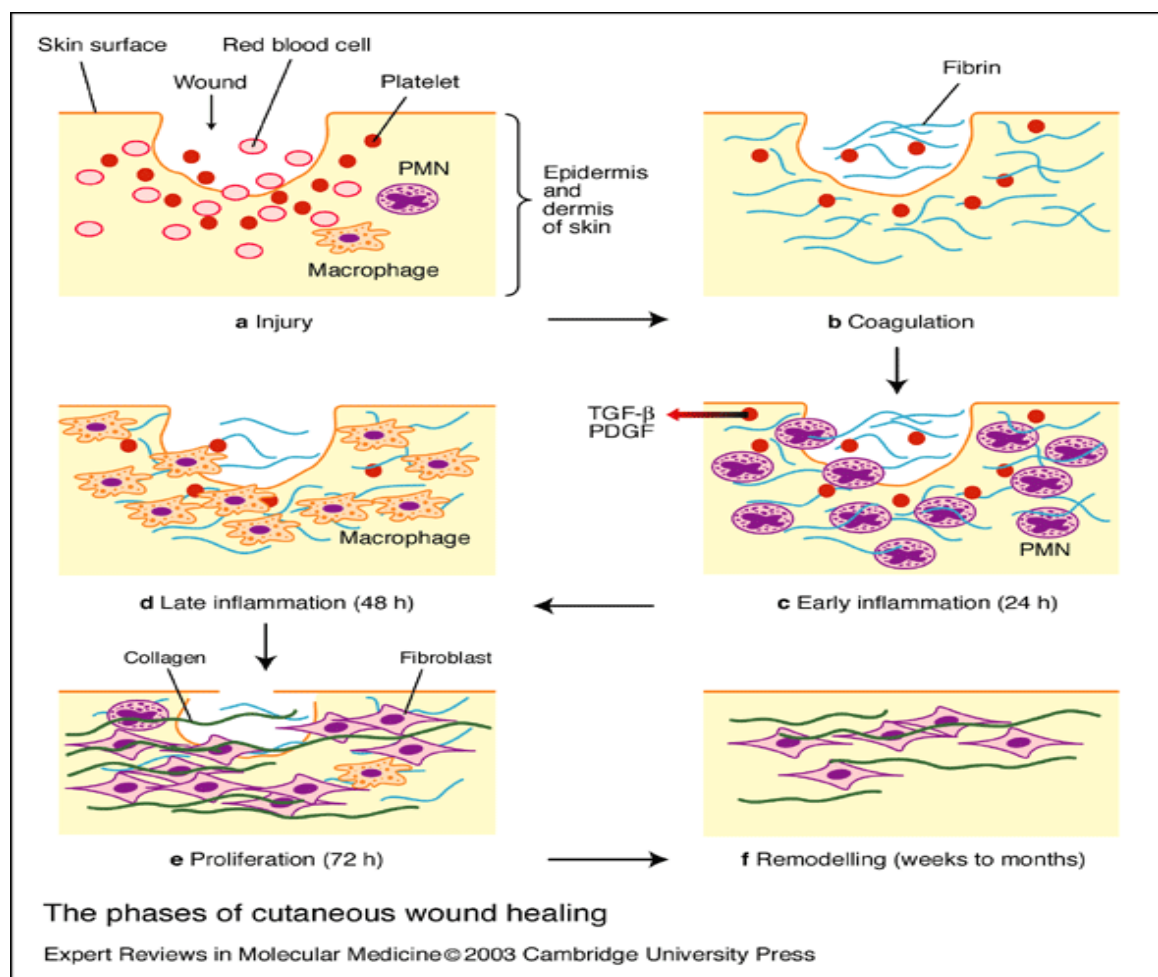


**Figur 3-8:** Polysakkarider stimulerer en rekke makrofagresponser. Forkortelser: IL, interleukin; IFN, interferon; TNF- $\alpha$ , tumor nekrosefaktor  $\alpha$ ; GM-CSF, granulocyt/makrofag koloni-stimulerende faktor; MCP-1, monocyt kjemoattraktant protein-1; NO, nitrogenoksid (Schepetkin og Quinn 2006).

Trolig medieres plantepolysakkariders makrofagaktivering først og fremst ved spesifikke overflatereseptorerers gjenkjennelse av polymerene. Reseptorene beskrives ofte som mønstergjenkjennende og kan kjenne igjen og binde fremmede ligander i initieringsfasen av immunresponsen (Gordon, 2002). Man kan tenke seg at makrofager binder plante polysakkardier og/eller glykoproteiner vha Toll-lignende reseptorer 4 (TLR4), CD14, CR3, scavenger-reseptorer, lektin-1- og Man-reseptorer. Aktivering av disse reseptorene fører til intracellulære signalkaskader som bl.a. resulterer i produksjon og frigjøring av inflammatoriske cytokiner (Schepetkin og Quinn, 2006). Potensielle pektinreseptorer er ikke kartlagt.

### 3.3. Sårheling

Sårheling er en kompleks prosess som involverer hemostase, inflammasjon, angiogenese og regenerering av huden. De fleste makrofager som deltar i prosessen kommer fra blodsirkulasjonen som monocytt under den inflammatoriske fasen. På stedet vil de så utvikles til makrofager. Komplementsystemet er en viktig aktør i den uspesifikke immunresponsen. Proteolytisk spaltning av komplementkomponenter genererer biologisk aktive spaltningsprodukter som kan øke lokal vaskulær permeabilitet, tiltrekke leukocytter (kjemotakse), mediere immunadherens og modulere antistoffproduksjon (Martin, 1997). Figur 3-9 illustrerer sårhelingsprosessen.



**Figur 3-9:** Regenerering av et sår har flere faser (Cambridge University Press, 2003)

### 3.4. *Biophytum petersianum* Klotzsch

#### 3.4.1. Taksonomi

(IPNI og w<sup>3</sup> TROPICOS, 2007)

Rike:	<i>Plantae</i>
Divisjon:	<i>Magnoliophyta</i>
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i>
Underklasse:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Oxalidales</i>
Familie:	<i>Oxalidaceae</i>
Slekt:	<i>Biophytum</i>
Art:	<i>Biophytum petersianum</i> Klotzsch (antatt synonymt navn; <i>Biophytum sensitivum</i> (L.) DC.)

#### 3.4.2. Botanikk

Oxalidaceae kalles gaukesyrefamilien på norsk, og består av planter med næringsrike stengler og 5-tallige blomster.

*Biophytum petersianum* Klotzsch blir opp til 25 cm lang. Den er å finne fra Senegal til Vest-Kamerun, og også hyppig forekommende i tropisk og subtropisk Afrika, og over Asia til New Guinea. Planten liker seg godt i tørr og sandete jord. Bladene er svært følsomme, og folder seg sammen etter været, og lukker seg ved berøring (Burkhill, 1997).

I studier og litteratur beskrives to typer *Biophytum*; *B. petersianum* og *B. sensitivum*. Variantene beskrives så likt og er så like at det er mulig dette er den samme planten (Figur 3-10). Flere søkedatabaser betegner plantene som synonyme (IPNI, 2007 og w<sup>3</sup> TROPICOS, 2007), men det kan likevel ikke trekkes sikre konklusjoner på nåværende tidspunkt.



**Figur 3-10:** Bilde til venstre *B. petersianum* Klotzch, bildet til høyre viser *B. sensitivum* (L.) DC (Flora of Zimbabwe 2007 og Botanic 2007)

### 3.4.3. Tradisjonell bruk

De følsomme bladene har resultert i svært fantasifull folkløse, og planten har blitt brukt mye i sammenheng med forskjellige ritualer. Men *B. petersianum* har også flere medisinske bruksområder både i Mali og i andre afrikanske land som vist i tabell 3-1 (Burkhill, 1997). I Malis tradisjonelle medisin brukes *B. petersianum* i behandlingen av malaria, feber, sår og forskjellige typer hudlidelser (Diallo *et al.*, 2002). Figur 3-11 viser et eksempel på hvordan planten kan oppbevares av healer.

**Tabell 3-1:** Eksempler på tradisjonell bruk av *B. petersianum* (Burkhill, 1997)

Indikasjon/bruksområde	Plantedel	Tilberedning	Område
Sår	Saft fra planten	Saft fra plante og citron blandes	Elfenbenskysten
Brekkmiddel Skorpionstikk Slangebitt Sår	Røtter og frø		Gabon Kamerun Mozambique Nigeria
	Frø	Knuses og blandes med sheasmør	
Gonore og nyresten	Røtter	Dekokt	Nigeria
Magesmerter			Nigeria
Migrene	Hele planten	Macerasjon	Ubangi
Pusteproblemer	Hele planten	Aske av plante blandes med olje	Ubangi
Brekkmiddel	Røtter og frø	Dekokt	Zaire



**Figur 3-11:** *Biophytum petersianum*, slik planten ble oppbevart av healer i Mali (Foto: Diallo, 2007)

#### 3.4.4. Tidligere studier

Det er gjort få studier på *B. petersianum*. Det er kjent at den brukes i tradisjonell medisin, men bare én studie på bioaktive forbindelser med høy molekylvekt er gjort. Et vannekstrakt av *B. petersianum* ble vist å ha en potent aktivitet på komplementsystemet (Inngjerdingen *et al.*, 2006). Det har blitt rapportert at *B. petersianum* har en hypoglykemisk og hypotensiv virkning på gnagere. Studien demonstrerte at et semi-etanolisk ekstrakt av *B. petersianum* stimulerte kortikosteroid og aldosteronsekresjon fra rotte der kjertler i binyrebarken ble perfundert med ekstraktet (Kodjo *et al.* 2006).

Det er gjort flere studier på *B. sensitivum*, alle mht lavmolekylære bioaktive forbindelser, og forskjellige polyfenoliske varianter har blitt observert. Disse forbindelsene har blitt rapportert å påvirke COX-1 og COX-2 systemet (Bucar *et al.* 1998) og utøver insulinotrop og hypoglykemiske effekt i forsøk på dyr (Puri, 2001). Et vannekstrakt av *B. sensitivum* viste god antiinflammatorisk aktivitet (Jachak *et al.*, 1999). Ettersom polysakkarider ekstraheres med vann, er det mulig at den antiinflammatoriske aktiviteten kan tilskrives dette.

## 4. Oppgavens målsetning

Denne hovedoppgaven hadde følgende overordnede mål:

Å videreføre studier over polysakkarider fra *B. petersianum* påbegynt av Inngjerdingen i perioden 2002-2006. Polysakkaridene skulle isoleres og karakteriseres med hensyn på karbohydratinnhold og struktur. I tillegg skulle det legges særlig vekt på å studere biologisk aktivitet relatert til immunsystemet og struktur-aktivitetsforhold i disse biologiske systemene, og biologisk aktivitet etter enzymdegradering.

Det skulle gjøres etnofarmakologiske studier i Mali. Healerintervjuer i ulike områder av landet skulle gjennomføres for å samle informasjon om medisinsk bruk av *B. petersianum*, der hensikten var å få økt kjennskap til tradisjonell bruk av planten.



## 5. Materialer og metoder

### 5.1. *Generelle metoder*

#### 5.1.1. Vannkvalitet

Hvis ikke annet er presisert ble det benyttet destillert vann til alle metoder.

#### 5.1.2. Innveiing

Analysevekt: Sartorius BP 221S  
Sartorius BP 121S (FHI)  
Overskålsvekt: OHAUS PORTABLE Advanced

#### 5.1.3. Sentrifugering

Multifuge 4KR, Heraeus Kendro (FI)  
MSE bordsentrifuge (FI)  
CP Centrifuge (Beckmann) (FHI)  
DuPont Instruments RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (Sorvall®)

#### 5.1.4. Filtrering

Glassfiberfilter: Glassfaser nr 125 og 90 mm (Schleicher og Schüell)  
Membranfilter: Acro® 50A Device with 0,45 µm Tuffryn® Membrane (Life science)  
Millex® GP-filter unit 0,22 µm (Millipore)  
Millex® HA –Syringe Driven Filter Unit 0,8 µm (Millipore)  
Millex® HA –Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm (Millipore)  
Acro® 50A Device with 5µm Versapore® membrane (PALLaboratory)  
Acrodisc 37 mm Syringe Filter 1µm, glassfibermembran (Life Sciences)  
Acro® 50A Device with 1 µm glass filter membrane (PALL Gelman Laboratory)

Nutsj og vakuumpopsats ble benyttet for store væskemengder og sprøyte med filterenhet for mindre mengder.

### 5.1.5. Avgassing og evakuering av luft

Avgassing av løsninger ble gjort ved hjelp av vakuum fra vannstråle eller pumpe, eller ved å gjennomoble helium i 10-20 minutter avhengig av volum.

### 5.1.6. Volumreduksjon

#### **Prinsipp**

Volumet av væsker kan reduseres og konsentrasjonen kan økes ved å dampe inn løsningen på rotavapor. På denne måten kan også flyktige organiske forbindelser som f.eks toluen fjernes.

#### **Utstyr**

Rotavapor (Büchi R-200) med vakuumpumpe og kjøleoppsats.  
Pærekolbe.

#### **Prosedyre**

Løsningene ble dampet inn på rotavapor ved 40-55 °C under vakuum.

### 5.1.7. Vask av dialyseslanger

#### **Prinsipp**

For å fjerne eventuelle celluloserester ble dialyseslangene vasket før bruk.

#### **Utstyr**

Dialyseslanger    Spectra/Por® MWCO 3.500 Da, d: 29 mm

Begerglass

Hansker og briller

Kokeplate                      IKA COMBIMAG RCH (Janke & Kunkel KG)

### Reagenser

2% NaOH-løsning

0,05% natriumazidløsning ( $\text{NaN}_3$ )

Destillert vann

### Prosedyre

1. Dialyseslangen ble klippet i en ønsket lengde (50-60 cm) og skylt godt under springvann.
2. Slangene ble så kokt i 10 minutter i 2% NaOH-løsning.
3. Etter koking ble slangene skylt grundig, inn- og utvendig. Først med springvann og deretter med destillert vann.
4. Slangene ble så kokt i destillert vann i 10 minutter. Deretter ble slangene skylt i destillert vann
5. Frem til bruk ble slangene oppbevart i 0.05% natriumazidløsning i kjøleskap for å hindre bakterievekst.

## 5.1.8. Dialyse

### Prinsipp

Dialyse gjøres for å rense løsninger for salter og andre lavmolekylære forbindelser. De stoffer med en molekylvekt som er lavere enn dialyseslangens cut off-verdi (MWCO) vil diffundere ut gjennom slangens porer så lenge det er en konsentrasjonsforskjell. Derfor er det viktig å jevnlig skifte væsken på utsiden av slangen for å opprettholde den osmotiske gradienten.

### Utstyr

Dialyseklemmer

Magnet og magnetrører

Glasstaver

Dialyseslanger: Spectra/Por®3, MWCO 3.5000 Da, d:29 mm/ Spectra/Por® MWCO 1.000 Da, d: 29 mm

Begerglass

### Reagenser

Toluen

AgNO<sub>3</sub>-løsning (mettet)

### Prosedyre

1. Dialyseslangene ble lukket i en ende med klemme og fylt med litt destillert vann for å kontrollere at den var tett.
2. Slangene ble holdt over et stort begerglass og fylt 2/3 fullt med prøveløsning
3. 1-2 dråper toluen ble tilsatt for konservering.
4. Luft ble så fjernet fra slangene som ble lukket i den åpne enden.
5. Slangene ble så overført til et stort begerglass med destillert vann og dialysert i et døgn under stadig omrøring med magnet. Glasstaver forhindret magneten i å komme i direkte kontakt med slangene.
6. Når 2 ml vann fra begerglasset ikke lenger ble blakket av en dråpe AgNO<sub>3</sub>-løsning, ble dialysen avsluttet.

#### 5.1.9. Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet ved hjelp av:

- Whirlimixer (Fisons)
- MS2 Minishaker (IKA ©)

#### 5.1.10. Frysetørking

##### Prinsipp

Prøver ble tørket ved at vann ble fjernet fra frossen prøve ved sublimering ved hjelp av vakuum.

##### Utstyr

Frysetørker: Christ® Alpha 1-4  
Christ® Alpha 1-6

Hetofrig metanolbad (Heto Birkerød, Danmark)

### **Prosedyre**

1. Prøveløsning ble redusert til ønsket mengde ved hjelp av rotavapor.
2. Prøveløsning med nedfrosset på metanolbad ved  $-40^{\circ}\text{C}$  eller i fryser.
3. Rundkolber med glassull i åpningen ble festet utenpå frysetørker og prøver i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og satt inn i frysetørker.
4. Prøvene ble tatt av frysetørker når kolben hadde nådd romtemperatur. Dette tok normalt 24-48 timer.

## **5.1.11.Syrevask av glassutstyr**

### **Prinsipp**

Glassutstyr som har vært lagret i papp- og papiremballasje kan inneholde forurensninger av cellulose. For å fjerne disse og andre potensielle karbohydratforurensninger før karbohydratanalyser, vaskes utstyret i konsentrert saltsyre. Dette spalter polysakkaridene og de fjernes ved grundig skylling i etterkant.

### **Utstyr**

Varmeskap

Hansker og briller

### **Reagenser**

Konsentrert HCl

Springvann

Destillert vann

### **Prosedyre**

Glassutstyret ble fylt/dekket av saltsyre. Henstand i 30 minutter.

Utstyret ble skylt 3-4 ganger og tørket i varmeskap i  $80^{\circ}\text{C}$ .

## **5.1.12.pH-måling**

pH-strips: Neutralit® pH 1-14 (Merck)

### 5.1.13. Absorbansmåling

BIORAD MODEL 3350 mikropateleser (FI)

Thermomax mikropateleser (FHI)

## 5.2. *Isolering av polysakkarider*

### 5.2.1. Diklormetane ekstraksjon

#### **Prinsipp**

Lavmolekylære og upolare organiske forbindelser kan interferere med polysakkaridanalyser. For å fjerne disse ble plantematerialet ekstrahert med diklormetan (DCM).

#### **Utstyr**

Varmemantel

Rundkolbe

Soxhletkolonne tilkoblet kjøler

Soxhlethylse

#### **Reagenser**

Diklormetan (Merck)

#### **Prosedyre**

1. 350 g plantemateriale ble lagt i hylsen fordelt på to omganger.
2. DCM helles i hylsen og krefter trekker væsken ned i rundkolben etter hevertprinsippet.
3. Hylsen fylles opp tilstrekkelig antall ganger til å få et egnet DCM volum, ca 4 liter.
4. Prøvematerialet ble ekstrahert til ekstraktet var nesten fargeløst.

### 5.2.2. Metanolekstraksjon

#### Prinsipp

For å fjerne lavmolekylære og upolare stoffer som kan interferere med polysakkaridanalyser ble plantematerialet ekstrahert med metanol (MeOH). MeOH ble gjort for å få med stoffer som ikke løste seg i DCM.

#### Utstyr

Varmemantel

Rundkolbe

Soxhletkolonne tilkoblet kjøler

Soxhlethylse

#### Reagenser

Metanol 96% (Merck)

#### Prosedyre

1. Oppsatsen med plantemateriale fra metode 1.2.1 ble brukt.
2. MeOH helles i hylsen, krefter trekker væsken ned i rundkolben når røret med hylsen er tilstrekkelig fylt.
3. Punkt 2 ble gjentatt 2-3 ganger til et egnet volum med MeOH var oppnådd, ca 4 liter.
4. Prøvematerialet ble ekstrahert til ekstraktet var nesten fargeløst.
5. Plantematerialet ble tatt ut av filteret og lagt til tørking på aluminiumsfolie i romtemperatur.

### 5.2.3. Vannekestraksjon

#### Prinsipp

Vann er et polart løsningsmiddel og er derfor egnet til bruk på polysakkarider.

Polysakkarider har varierende grad av løselighet, og dette medfører at de løses opp ved forskjellige temperaturer. Ved å ekstrahere materialet ved to forskjellige temperaturer oppnår man dermed to fraksjoner med forskjellig sammensetning av polysakkarider.

### **Utstyr**

Stort begerglass, 4L

Termometer

Kokeplate med magnetrører og magnet

Trakt

Aluminiumsfolie

Utstyr til filtrering gjennom glassfiberfilter med nutsj og vannstrålevakuum

Sentrifuge Multifuge 4KR, Heraeus Kendro

Rotavapor

### **Reagenser**

Vann

### **Prosedyre**

1. Tørket plantemateriale fra metode 5.2.2, (ca 290 g), ble overført til begerglass med magnet og ca 3L vann ble tilsatt (ca 10 ml/g).
2. Plantematerialet ble ekstrahert ved 50°C i ca 2 timer under omrøring. Begerglasset var dekket med aluminiumsfolie for å holde varmen og hindre fordamping.  
Temperaturen ble kontrollert vha termometer
3. Blandingen ble sentrifugert på 4000 rpm i 10 minutter, deretter ble de resterende partikler fjernet vha filtrering med glassfiberfilter med nutsj og vannstrålevakuum.
4. Punkt 1.- 3. ble gjentatt.
5. Punkt 1 ble gjentatt
6. Plantematerialet ble ekstrahert ved koking under omrøring i 1 time.
7. Punkt 3 og 4 ble gjentatt
8. Ekstraktene ble slått sammen og dampet inn på rotavapor (metode 5.1.6) og deretter dialysert (metode 5.1.8).



## 5.2.4. Gelfiltrering

### Prinsipp

(Greibrokk *et al.*, 1998)

Gelfiltrering er en kromatografisk metode som separerer substanser etter molekylstørrelse der de største molekylene elueres ut først. Pakkematerialet er den stasjonære fasen og det vandige systemet inne i kornene utgjør det kontinuerlige systemet. Molekyler som er for store til å trenge inn i det porøse materialet vil vandre gjennom kolonnen med mobilfase og elueres ut først med voidvolumet ( $V_0$ ). Molekyler som er av mindre størrelse vil vandre inn i partiklene og avhengig av størrelse, ladning og diffusjonsevne bli eluert ut i ulik grad med mobilfase. Det er viktig å velge et gelmateriale som har en egnet porestørrelse og dermed riktig fraksjoneringsområde i forhold til den løsningen som skal elueres på kolonnen.

### 5.2.4.1. Bio-Gel® P-2 Fine

(BioRad Laboratories instruksjonshefte)

Bio-Gel® P-2 Fine er laget av meget hydrofilt og porøst pakkemateriale av polyakrylamid. Partiklene er dannet ved en kopolymerisering av akrylamid og N,N'-metylen-bis-akrylamid. Gelen er tilnærmet fri for ladning og er derfor god til å separere ladede molekyler etter størrelse. Bio-Gel® P-2 Fine har en partikkelstørrelse på 45-90  $\mu\text{m}$  og dette gir et egnet fraksjoneringsområde mellom 100-1800 Da. Bio-Gel® P-2 Fine er derfor egnet til å separere de store polysakkaridene fra de mindre molekylene og salter som finnes i råekstraktet.

### Utstyr

Kolonne:	Pharmacia
	Lengde: 60cm Diameter: 5 cm
Matriks:	Bio-Gel® P2 Fine
Partikkelstørrelse:	45-90 $\mu\text{m}$
Kolonnevolum:	1060 mL
Pumpe:	Pump P-1 (Amersham Biosciences)
Fraksjonssamler:	LKB SuperFrac (Pharmacia Biotech)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)

Mikrofilter: Acro® 50A Device with 5µm Versapore® membrane  
(PALL Laboratory)  
Acrodisc 37 mm Syringe Filter 1µm, glassfibermembran  
(Life Sciences)

Plastsprøyte BD

Erlenmeyerkolbe til vakuumfiltrering

### Reagenser

Vann degasset med He-gass

### Betingelser

Elueringshastighet: 1 ml/min  
Fraksjonssamler: Prøver 10 min/rør (10 ml per rør)  
Prøvemengde: 100 ml råekstrakt filtrert 5µm og deretter 1µm  
Elueringsmiddel: Destillert vann

### Prosedyre

A: Preparering av gel og pakking av kolonne

1. Mengde pakkemateriale ble beregnet til å være 353,3 g ut ifra kolonnens volum.
2. 1 del tørr Bio-Gel P2 Fine (353,3 g) ble gradvis tilsatt 2 deler vann i en erlenmeyerkolbe og satt til henstand i 4 timer i romtemperatur.
3. Halvparten av supernatanten ble dekantert, og gelen ble så degasset vha vannsug i 10 minutter.
4. To gelvolum med degasset vann ble tilsatt, og kolben ble forsiktig rotert. Supernatanten ble dekantert når 90-95% av partiklene hadde lagt seg.
5. Punkt 4 ble gjentatt 3 ganger for å fjerne over 90% av partiklene.
6. Kolonnematerialet ble overført til kolonne i en omgang vha en glasstav for å hindre dannelse av luftbobler i gelmatriksen.
7. Vann ble pumpet gjennom kolonnen over natten for å pakke kolonnematerialet.

B: Applisering og eluering

1. Ekstrakt med et volum på 10% (ca 100 ml) av kolonnevolumet ble påsatt med en hastighet på 1ml/min. På forhånd ble ekstraktet filtrert først 5µm og deretter 1µm.
2. Det ble samlet fraksjoner på 10 ml.
3. Elueringsprofil av karbohydratene ble bestemt vha fenolsvovelsyretest (metode 5.3.3).

4. På bakgrunn av testresultatet ble rørene slått sammen i ulike fraksjoner.
5. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var blitt fraksjonert.

#### C: Vasking og konservering av kolonnen

1. Kolonnen ble snudd 180° og løsning med 50mM NaCl ble pumpet gjennom over natten.
2. 2 kolonnevolum med 0,2M NaCl-løsning ble pumpet igjennom.
3. Kolonnen ble vasket med fem kolonnevolum vann.
4. Kolonnen ble konserverert med 0,05% natriumazid og deretter oppbevart på kjølerom.

#### 5.2.4.2. PD-10 Desalting column

##### **Prinsipp**

(AmershamPharmaciaBiotech, instruksjonshefte)

PD-10 er ferdigpakke kolonner med Sephadex™ G-25 medium som brukes til å separere høymolekylære (HMW) substanser (>5000 Da) fra lavmolekylære (LMW) substanser (<1000 Da) ved å desalte materialet. Partiklene i gelmaterialet ligger i størrelsesområdet 85-260 µm.

##### **Utstyr**

Kolonne:	PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) H: 5cmD: 1,5cm
Kolonnevolum:	13,5 ml
Matriks:	Sephadex™ G-25
Filter:	Acro® 50A Device with 0,45 µm HT Tuffryn® Membrane (PALL Gelman Laboratories)
Oppsamlingsrør:	Glassrør, ca 5 ml
Plastsprøyte	BD

##### **Prosedyre**

1. Kolonne ble ekvilibrert med 25 ml vann.
2. 2,5 ml prøveløsning ble filtrert 0,45 µm og applisert på kolonnen.
3. Prøve ble eluert med 16 ml vann og fraksjoner på ca 1,0 ml ble samlet opp.
4. Punkt 2 og 3 ble gjentatt.

5. Hvert rør ble testet for karbohydratinnhold vha fenolsvovelsyretest, metode 5.3.3  
Fraksjoner ble på bakgrunn av dette slått sammen.
6. Prøvene ble frysetørket etter metode 5.1.10

### 5.2.5. Ionebytterkromatografi

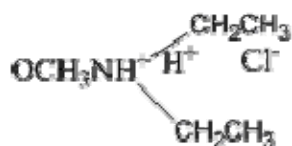
#### Prinsipp

(Greibrokk *et al.*, 1998)

Ionebytterkromatografi separerer stoffer i prøveløsningen ved at deres ioniske eller ioniserbare grupper har forskjellig elektrostatisk tiltrekning til stasjonærfasens ioniske funksjon. Ladede grupper adsorberes reversibelt til stasjonærfasens kovalent bundne ioniske eller ioniserbare grupper av motsatt ladning. De adsorberte stoffene elueres ut vha mobilfaser med ulike ionestyrke. Polysakkarider som er bygget opp av forskjellige monosakkarider vil ha forskjellig grad av negativ ladning og antall ladede grupper. De kan dermed separeres i henhold til ladning.

#### 5.2.5.1. DEAE Sepharose® Fast Flow/ ANX Sepharose 4 Fast Flow

*DEAE Sepharose® Fast flow* består av et svakt anionbyttet materiale med diethylaminoetyl (DEAE) som kation (Figur 5-1) heftet til sterkt kryssbundet agarose (d=34 µm). Kationen har klorid bundet til seg som motion. De negativt ladde, eller sure, polysakkaridene binder seg med ulik styrke til kationen og kan elueres ut separert etter økende surhetsgrad, med økende ionestyrke på gradienten. Nøytrale polysakkarider vil ikke interagere med kolonnematerialet og kan elueres ut med vann før de sure molekylene elueres med NaCl-gradient.



*DEAE med Cl<sup>-</sup> som motion*

Figur 5-1

*ANX Sepharose 4 Fast Flow* består som DEAE Sepharose Fast Flow av en anionbytter som er tilbundet kryssbundet agarose, men de skiller seg fra hverandre i lengden på karbonkjedene til de ladede gruppene (Figur 5-2). Her er det dietylaminopropyl og ikke dietylminoetyl som er hektet til agarosen. Også dette materialet er godt egnet til separasjon og rensing av HMW-forbindelser som karbohydrater.



*ANX med Cl<sup>-</sup> som motion*

**Figur 5-2**

### Utstyr

Kolonne:	Pharmacia h: 30 cm d: 5cm (DEAE) Pharmacia h: 15 cm d: 5 cm (ANX)
Matriks:	DEAE Sepharose® Fast Flow i 20 % etanol (AmershamPharmaciaBiotech) ANX Sepharose 4 Fast Flow (AmershamPharmaciaBiotech)
Kolonnevolum:	500 ml (DEAE) 300 ml (ANX)
Porestørrelse:	45-165 µm
Pumpe:	P-1 (AmershamPharmaciaBiotech)
Fraksjonssamler:	LKB SuperFrac (Pharmacia)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør RB, plast, 15 ml (Heger AS)
Filter:	Millex® GP-filter unit 0,22 µm (Millipore) Acro® 50A Device with 5µm Versapore® membrane (PALLaboratory)
Erlenmeyerkolbe	
Glasstav	
Nutsj og vakuumsugoppsats	

**Prosedyre****A: Pakking av kolonne**

1. Romtemperert kolonnemateriale ble oppslemmet og luft ble fjernet vha. vannstrålevakuum.
2. Kolonnematerialet ble overført til kolonne vha. en glasstav for å hindre dannelse av luftlommer i matriks.
3. Vann ble pumpet gjennom kolonne for å pakke kolonnematerialet og fjerne etanol

**Reagenser**

Vann

2 M NaCl (Merck)

1 M natriumacetat, justert til pH 3 med konsentrert HCl

0,5 M NaOH

0,05 % NaN<sub>3</sub>

Mettet AgNO<sub>3</sub>-løsning

Alle løsninger som skulle appliseres på kolonne ble degasset og filtrert 0,22 µm.

**B: Beregning av saltgradient**

For å beregne saltgradienten ble følgende likning benyttet:

$$C/T = (C_0 \times R)/V_0$$

C = konsentrasjonen NaCl ved tiden "T"

T = hvor lang tid forsøket skal ta

C<sub>0</sub> = Startkonsentrasjonen av NaCl i saltløsningen

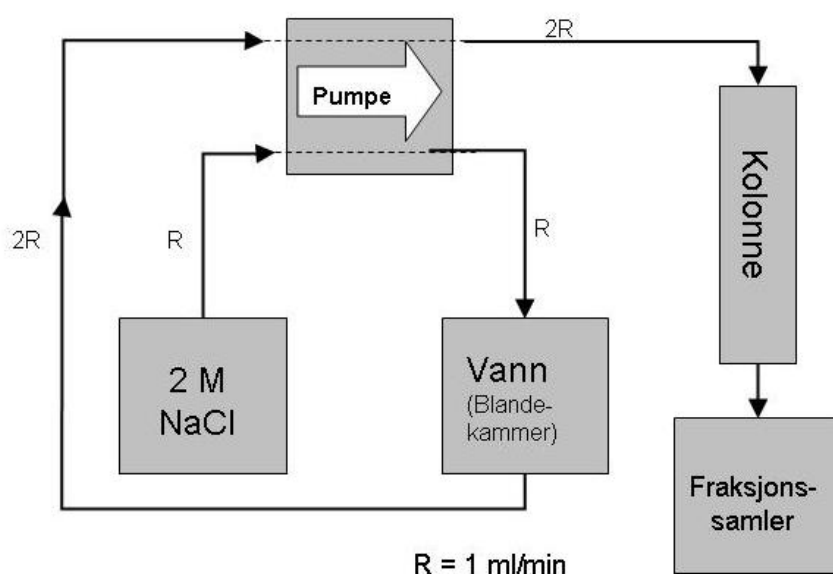
R = Flowhastigheten fra saltløsning til blandekar

V<sub>0</sub> = Mengde vann i blandekaret ved tiden T = 0

**C: Applisering og eluering**

1. Ekstrakter ble filtrert gjennom 5 µm og 0,22 µm filter og applisert (200-250 ml) på kolonnen med en hastighet på 1 ml/min.
2. Nøytrale polysakkarider ble eluert med ca 2 kolonnevolum vann og samlet i en fraksjon. Hastighet 2 ml/min.
3. Sure polysakkarider ble så eluert med NaCl-gradient fra vann til ca 1,5 M NaCl over 12 timer.

4. 10 ml fraksjoner ble samlet opp og testet ved hjelp av fenolsvovelsyretest (FS-test), metode 5.3.3, for å slå fast karbohydratelueringprofilen.
5. Kolonne ble til slutt eluert med 2 M NaCl til fenolsvovelsyretest (metode 5.3.3) ikke lenger viste tegn til karbohydratinnhold.
6. Fraksjonsvolum ble redusert (metode 5.1.6) før fraksjonene ble dialysert (metode 5.1.8) og deretter frysetørket (metode 5.1.10).



**Figur 5-3:** Oppsett for generering av NaCl-gradient (Rusten, 2006)

B: Vask og regenerering av kolonne

### Reagenser

1 M natriumacetat justert til pH3 med konsentrert HCl

0,5 M NaOH

2 M NaCl

Vann

0,05% NaN<sub>3</sub>

Mettet AgNO<sub>3</sub>-løsning

### Prosedyre

1. Skittent kolonnemateriale ble vasket før påsetting av ny prøve.
2. Hvis det øverste laget av kolonne var sterkt farget, ble det fjernet med en pasteurpipette.

3. Kolonnen ble snudd 180°.
4. Kolonnen ble eluert med 1 kolonnevolum 1M natriumacetat pH 3.
5. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 0,5 M NaOH.
6. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum natriumacetat pH 3.
7. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 2M NaCl.
8. Kolonnen ble eluert med 5 kolonnevolum destillert vann til slutt, og det ble sjekket at Cl<sup>-</sup> ioner ikke var tilstede ved hjelp av en mettet AgNO<sub>3</sub>-løsning.
9. Kolonnen ble evt konserverert med 0,05% NaN<sub>3</sub> og oppbevart ved 4 °C.

### 5.3. Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinnhold

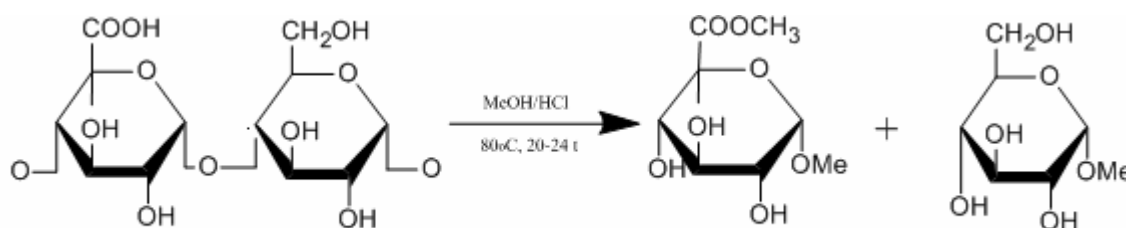
#### 5.3.1. Monosakkaridbestemmelse

##### 5.3.1.1. Metanolyse

##### Prinsipp

(Chambers og Clamp, 1971)

Glykosidbindingene mellom polysakkaridenes monomerer brytes i surt, vannfritt metanolmiljø. Dette medfører at det dannes metylglykosider av de enkelte monosakkaridene ved at OH-gruppene som er bundet til posisjon C-1 metyleres. COOH-gruppene i C-6-posisjon på uronsyrene forestres med metylgrupper. Det vannfrie miljøet forhindrer hydrolyse.



**Figur 5-4:** Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid (Inngjerdingen, 2000)

##### Utstyr

Alt glassutstyr syrevasket

Supelco-rør (4 ml) med teflonbelagt (PTFE/liner) skrukork (Supelco)



Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

2 ml glasspipette med pelesballong

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-evakuert vakuumeksikator

Reacti-Therm™ III Heating Module (Varmeenhet for tørking under N<sub>2</sub>-gass) (Pierce)

Heliumgassbeholder

### Reagenser

4 M HCl i MeOH

1 µg/µl mannitol i 1 M HCl i MeOH (intern standard)

Vannfri MeOH (Merck)

### Prosedyre

1. 0,5-1 mg prøvemateriale ble innveid i syrevasket Supelco-rør.
2. Røret ble dekket med perforert parafilm og tørket i evakuert P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-eksikator i minimum 24 timer ved romtemperatur.
3. 1 ml 4 M HCl i MeOH og 100 µl intern standard (ca 10 % av avveid prøvemateriale, evt. 25 % av totalt sukkerinnhold) ble tilsatt prøven.
4. Kork ble skrudd på Supelco-røret og satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter ca 15 minutter ble korken skrudd til igjen for å forhindre metanolfordamping.
5. Prøven ble dampet til tørrhet under N<sub>2</sub>-gass ved ca 40 °C.
6. 200 µl vannfri MeOH ble tilsatt prøven som igjen ble dampet til tørrhet under N<sub>2</sub>-gass.
7. Trinn 6 ble gjentatt 2 ganger.
8. Prøven ble tørket i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-eksikator i minimum 1 time før den ble TMS-derivatisert som beskrevet (metode 5.3.1.2)

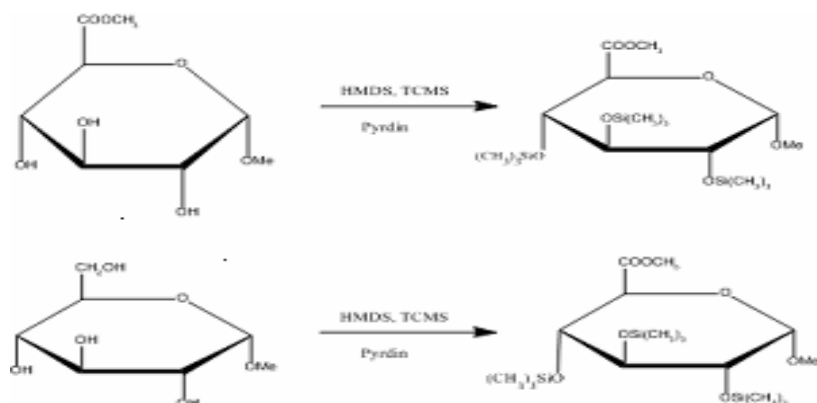
#### 5.3.1.2. TMS-derivatisering

### Prinsipp

(Sweeley *et al.*, 1963)

Monosakkarider er polare og lite flyktige forbindelser, noe som gjør dem lite egnet for gasskromatografisk analyse. For at de skal kunne analyseres ved hjelp av gasskromatografi, må det derfor lages derivater som er flyktige og termisk stabile. Dette

gjøres ved at man lar de frie, polare hydroksylgruppene i molekylene reagere med heksametyldisilazan (HMDS) og trimetylklorasilan (TMCS) til pertrimetylsilyleter, dvs. TMS-derivater. Pyridin anvendes som løsningsmiddel og katalysator.



**Figur 5-5:** Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (Inngjerdingen, 2000).

### Reagenser

TMS-reagens:	Trimetylklorasilan (TCMS) (Supelco)	1 ml
	Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich)	2 ml
	Pyridin, vannfri (Merck)	5 ml

### Utstyr

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)  
SMI Capillaries (blå)

### Prosedyre

1. Den metanolyserte prøven fra metode 5.3.1.1 ble tilsatt 200 µl TMS-reagens og blandet godt.
2. Prøven stod minst 30 minutter i romtemperatur før gasskromatografisk analyse (metode 5.3.1.3)

### 5.3.1.3. Gasskromatografi

#### Prinsipp

(Greibrokk *et al.*, 1998)

Gasskromatografi (GC) er en kolonnekromatografisk metode som separerer stoffer på bakgrunn av kokepunkt og interaksjoner med stasjonærfase. Mobilfase i GC kalles

bæregass og er en inert gass, både med hensyn på prøve og stasjonærfase. Stasjonærfase er oftest en ikke-flyktig væske i en tynn film på kolonnen med svært liten interaksjon med prøveløsningen.

Applisert prøve, som må være flyktig og stabil, fordamper i injektor og fraktes med bæregassen gjennom kolonne til detektor. Retensjonstiden styres av kolonnetemperaturen, og vil halveres for hver 30-graders temperaturøkning. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med en hastighet som er bestemt av deres flyktighet, løselighet i stasjonærfase og temperaturen. Prøvene detekteres av en flammeioniseringsdetektor (FID) bestående av en ren flamme av hydrogen og oksygen. Når organisk materiale fra prøven forbrennes i flammen, dannes ioner som detekteres som elektrisk strøm. Mengden ioner som produseres, og dermed også signalstyrken, er proporsjonal med mengden stoff som forbrennes.

Monosakkarider finnes på pyranose- eller furanoseform og hver av disse kan igjen ha  $\alpha$ - eller  $\beta$ -konfigurasjon. Monosakkarider finnes i både form og ringstruktur, og det innstiller seg en likevekt mellom formene. Ulike konfigurasjoner interagerer forskjellig med stasjonærfaser og i kromatogrammet vil det dermed dannes et karakteristisk mønster som benyttes til identifikasjon av monosakkarider. Kvantitative bestemmelser kan også gjøre ved hjelp av toppareal fra kromatogrammet, forhåndskjorte standardkurver og internstandarder som korregerer for tap under prøveopparbeidelse.

### Utstyr

Gasskromatograf: GC 6000 VEGA SERIES 2 (CARLO ERBA INSTRUMENTS)

Programmeringsenhet: ICU 600

Integrator: C-R6A CHROMATOPAC (Shimadzu)

Detektor: FID

Injektor: Splitt:splittless

Kolonne: DB5 (J&W Scientific) "Fused Silica" kapillærkolonne

Lengde: 25 m Indre diameter: 0,32 mm

Filmtykkelse: 0,25  $\mu$ m

Bæregass: Helium

### Betingelser for GC-systemet

Flow: Kolonne: 1,8 ml/min (37,6 cm/sek)

Splitt flow: ~ 11 ml/min  
Splittforhold: 1:6  
Injeksjonsvolum: 0,5-1,0 µl  
Injektortemperatur: 260 °C  
Detektortemperatur: 310 °C

Temperaturprogram:  
140 °C  $\xrightarrow{1\text{ °C/min}}$  170 °C  $\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$  250 °C

### Prosedyre

1. Det ble åpnet for gasstrømmene, GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt med pyridin.
3. 0,5-1,0 µl av den TMS-derivatiserte prøven (metode 5.3.1.2) ble injisert.
4. Sprøyten ble skylt med pyridin mellom hver prøveinjeksjon samt etter siste injeksjon.
5. Innstillingene på integratoren ble justert for å tilpasses kromatogrammet.
6. Gassen til FID ble skrudd av etter kjøring. Hele programmet tok ca 60 min

## 5.3.2. Gelfiltrering koblet til FPLC-apparatur

FPLC er en metode basert på gelfiltreringsprinsippet beskrevet i metode 5.2.4. Den ble opprinnelig utviklet for proteinseparasjon, men egner seg også godt for arbeid med polysakkarider.

### 5.3.2.1. Hiload™ 26/60 Superdex 200 prep grade

(AmershamPharmaciaBiotech, instruksjonshefte)

FPLC ble brukt til videre fraksjonering av testsubstanser. Superdex 200 prep grade kommer ferdigpakket i XK kolonner og består av dextran som er kovalent bundet til agarose. Separasjonsegenskapene bestemmes i all hovedsak av dextran-komponenten. Superdex 200 prep grade har et fraksjoneringsområde fra 1000-100 000 Da for dextraner noe som gjør den egnet for separasjon av polysakkarider. Det ble benyttet en UV-deteksjon ved 214 nm.

**Utstyr**

Kolonne:	XK 26/60 Lengde: 60cm Diameter: 2,6 cm
Matriks:	Superdex 200 prep grade
Partikkelstørrelse:	13 $\mu$ m
Kolonnevolum:	319-330 ml
ÄKTA-FPLC	(Amersham Pharmacia Biotech)
Dataprogram:	Unicorn v4.00.16
Skriver:	HP DeskJet 980
Pumpe:	P-920
Monitor:	UPC-900
Injektor:	Valve Inv-907 Superloop 50 ml
Fraksjonssamler:	Frac-900
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 7 ml (Heger AS)
Filter:	Millex® GP-filter unit 0,22 $\mu$ m (Millipore)
Plastsprøyte BD	5 ml og 10 ml
Begerglass	
Magnet/magnetrører	

**Reagenser**

Vann degasset med He-gass

**Betingelser**

Elueringshastighet:	2 ml/min
Fraksjonssamler:	Prøver 1-2,5 min/rør (2-5 ml per rør)
Prøvemengde:	6-13 ml BP II og BP II,I (5 mg/ml) filtrert 0,22 $\mu$ m
Elueringsmiddel:	Destillert vann

**Prosedyre**

A: Applisering og eluering

1. Prøve ble løst i elueringsmiddelet og ga et ekstrakt med en konsentrasjon på ca 5 mg/ml.

2. Ekstrakt med et volum på inntil 4% av kolonnevolumet ble påsatt med en hastighet på 1ml/min. På forhånd ble ekstraktet filtrert 0,22 µm.
3. Det ble samlet fraksjoner på 5 ml
4. Elueringsprofil av karbohydratene ble bestemt vha fenolsvovelsyretest (metode 5.3.3) og FPLC-system ved 214 nm.
5. På bakgrunn av testresultatet ble rørene slått sammen i ulike fraksjoner.
6. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var blitt fraksjonert.

#### B: Vasking og konservering av kolonnen

1. 1 kolonnevolum med 0,5M NaOH ble pumpet gjennom kolonnen.
2. Minst to kolonnevolum med vann ble så pumpet igjennom.
3. Kolonnen ble ved endt bruk konserverert med 20% etanol og deretter oppbevart på kjølerom.

#### 5.3.2.2. Superose 6 HR 10/300 pre packed GL

##### **Prinsipp**

(AmershamPharmaciaBiotech, instruksjonshefte)

Molekylvektsdistribusjon i polysakkaridprøver ble bestemt ved hjelp av gelfiltrering koblet til FPLC-apparatur og eluering med kjente dekstranstandarder. Det ble laget en standardkurve der logaritmen av molekylvekt ble plottet mot elueringsvolum. Superose 6 er en matriks bestående av sterkt kryssbundet agarose med optimalt separasjonsområde for globulære proteiner fra 5-5 000 kDa. Det ble benyttet UV-deteksjon ved 214 nm samt FS - test (metode 5.3.3).

##### **Utstyr**

ÄKTA-FPLC	(Amersham Pharmacia Biotech)
Kolonne:	Tricorn Superose 6 10/300 GL (ferdigpakket)
Volum:	24 ml
Pumpe:	P-920
Injektor:	Valve Inv-907
Monitor:	UPC 900
Fraksjonssamler:	Frac-900
Skriver:	HP DeskJet 980

Dataprogram: Unicorn v4.00.16

Sprøyte: 1 ml (Terumo)

Oppsamlingsrør: 7 ml (Heger AS)

Filter: Millex<sup>®</sup> HA Syringe driven Filter Unit, 0,45 µm, non-sterile

### Reagenser

Mobilfase: 10 mM NaCl, degasset og filtrert 0,45 µm

0,1 M NaOH

50 % eddiksyre (Prolabo)

20% etanol

### Systembetingelser

Konsentrasjon prøveløsninger: 2 mg/ml

Injeksjonsvolum: 500 µl

Elueringshastighet: 0,5 ml/min

### Standarder

Stoffer med kjent molekylvektsdistribusjon ble benyttet som standarder for å kunne lage en standardkurve som ble brukt til estimering av molekylvektsdistribusjon i prøvene.

Oversikt over standarder benyttet i forsøket vises i Tabell 5-1.

**Tabell 5-1:** Oversikt over molekylvekt av standarder brukt i forsøket

	Mw (Da)	Mn (Da)
<b>T500, lot 9307</b>	475 000	153 000
<b>T250, lot 8374</b>	233 000	123 000
<b>B512 (Dex 40T Fr 7, 8630)</b>	19 000	18 500
<b>B512 (Dex PD 5558 Fr 1)</b>	11 700	10750
<b>B512 (Fr 11640-II-IX)</b>	5 600	3 170
<b>B512 (Fraction 11640 – I-IV)</b>	2360	2000
<b>Dextran standard 31422</b>	150 000	
<b>Dextran standard 09184</b>	100 000	
<b>Dextran standard 31421</b>	80 000	
<b>Dextran standard 31420</b>	50 000	

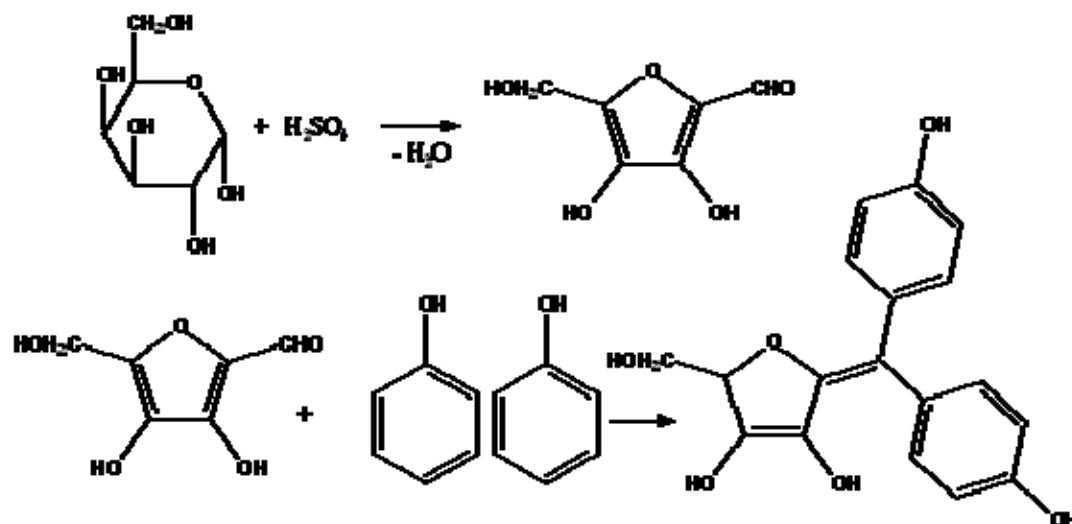
**Prosedyre**

1. 2 mg prøve eller dekstran ble løst i 2 ml 10 mM NaCl og filtrert 0,45  $\mu\text{m}$ .
2. 500  $\mu\text{l}$  ble injisert i FPLC og eluert ved 0,5 ml/min.
3. 25 fraksjoner à 1,0 ml ble samlet og karbohydratinhold ble bestemt ved hjelp av FS-test (metode 5.3.3).
4. Etter endt bruk ble kolonnen eluert med 20% etanol og plassert på kjølerom.

**5.3.3. Fenolsvovelsyretest****Prinsipp**

(Sturgeon, 1990 og Inngjerdingen, 2000)

Fenolsvovelsyretest (FS-test) benyttes til å bestemme karbohydratinhold i en løsning. På denne måten kan elueringsprofil for karbohydrater vises. Svovelsyre danner sammen med karbohydrater furfuraldehyder (anhydrosukker), som vil kondensere med fenol til et gulfarget kompleks. Styrken på gulfargen korrelerer direkte med mengde karbohydrat i prøven. Komplekset kan detekteres spektrofotometrisk ved 490 nm (synlig lys).



**Figur 5-6:** Reaksjon mellom et monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker som kondenserer med fenolmolekyler og danner et farget kompleks. (Inngjerdingen, 2000)

**Utstyr**

Finnpipette 40-200  $\mu\text{l}$  (Labsystems)  
 Gilson Microman® pipette 100  $\mu\text{l}$   
 Gilson Microman® pistons og spisser



Glassrør, 6 ml

Whirlimixer (Fisons)

Nunc-Immuno™Plate, MaxiSorp™Surface (NUNC™)

BIO-RAD MODEL 3550 Microplate Reader

Verneutstyr

### Reagenser

Fenol 4 % (Merck)

Konsentrert H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)

### Prosedyre

1. 100-200 µl av løsning som skulle testes ble overført til hvert sitt glassrør og tilsatt 200 µl 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Blandingen ble mikset godt og satt til henstand i romtemperatur i 30 minutter.
3. Blandingene ble mikset kort, og 100 µl fra hvert rør ble overført til brønner på en mikroplate. Det samme ble gjort med 100 µl destillert vann som referanseprøve.
4. Absorbans ble målt ved 490 nm, og plottet mot eluert volum fra kolonne.

## 5.4. Strukturoppklaring

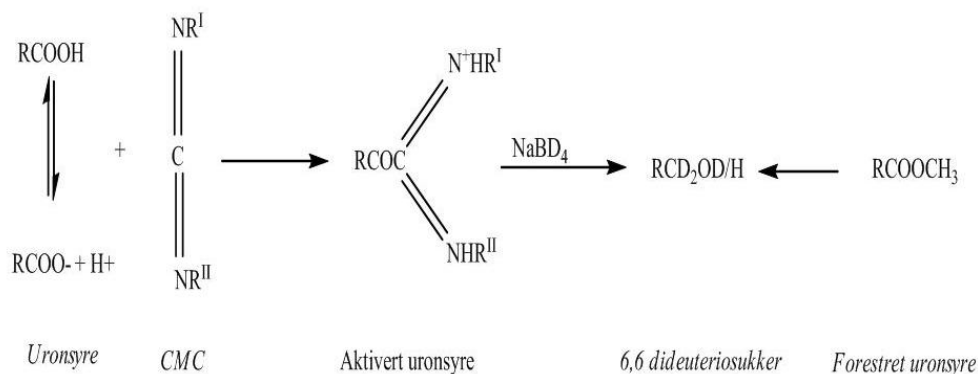
### 5.4.1. Metylering

#### 5.4.1.1. Karboksylsyre-reduksjon

#### Prinsipp

(Kim og Carpita, 1992)

Før metylering (metode 5.4.1) må esterifiserte polysakkarider og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyreenheter reduseres. Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte til deutererte primære alkoholer vha NaBD<sub>4</sub>, mens frie uronsyrer aktiveres med carbodiimid (CMC) før reduksjon. Det dannes 6,6-dideuteriosukkere som skilles fra nøytrale sukker ved GC-MS-analyser pga annen fragmentmasse ( $M^+ + 2$ ). GC-MS gir det totale antall uronsyrer, dvs både esterbundne og frie.



**Figur 5-7:** Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon av forestret uronsyre (Inngjerdingen, 2000).

### Utstyr

Metyleringsrør med skrukork (syrevasket)

Is

pH-papir

Dialyseslanger-Spectra/Por<sup>®</sup>3, MWCO: 1.000, d:29 mm

MS2 Minishake IKA<sup>®</sup>

Finn<sup>®</sup>-pipetter med spisser (Thermo Labsystems)

### Reagenser

500 mM imidazol-HCl

100 mg/ml NaBD<sub>4</sub> (Aldrich) i imidazol-HCl (nylaget)

Iseddik p.a. (Prolabo)

0,2 M MES (2-[N-morfolino]etansulfonsyre), pH 4,75 (Sigma)

2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9 (Sigma)

500 mg/ml carbodiimid (1-cykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)-carbodiimid-meto-p-toluensulfonat) (nylaget)

Oktanol (Merck)

Vann

### Prosedyre

- 1-2 mg prøve ble løst i 5 ml iskald 500 mM imidazol-HCl.
- Karboksylsyre ble redusert ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i imidazol-HCl (300 µl + 300 µl + 400 µl). Prøvene ble mikset og satt på is i 5 minutter etter de første to tilsetningene og 30 minutter etter siste tilsetning.

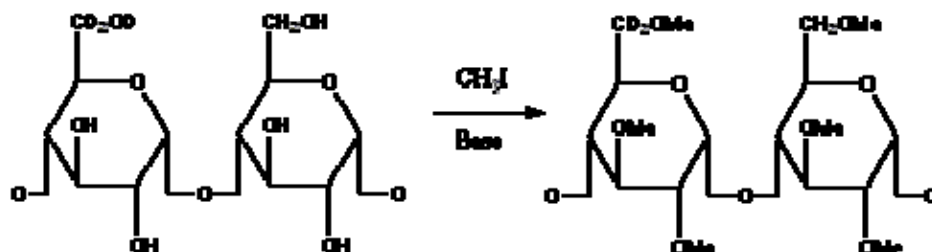
3. Overskudd av reaktant ble fjernet ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik.  
Reaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og pH < 7.
4. Prøvene ble dialysert etter metode 5.1.8
5. Prøvene ble deretter frysetørket (metode 5.1.10)
6. De frysetørkede prøvene (eller 1 mg av ikke-reduert prøve) ble løst i 1 ml vann og tilsatt 200 µl MES og 400 µl nylaget 500 mg/ml carbodiimid i destillert vann.
7. Løsningen ble så inkubert i 3 timer ved ca 25 °C.
8. 1 ml 2 M TRIZMA og 4 dråper oktanol (antiskummiddel) ble tilsatt, og prøven ble deretter avkjølt på is.
9. Prøvene ble tilsatt 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH og inkubert over natt ved 4 °C.
10. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik.  
Nøytraliseringsreaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og pH var < 7.
11. Prøvene ble dialysert (metode 5.1.8) og frysetørket (metode 5.1.10).

#### 5.4.1.2. Metylering

##### Prinsipp

(Ciucanu og Kerek, 1982)

Frie hydroksylgrupper i polysakkarider metyleres vha metyljodid etter deprotonering vha dimetylsulfoksid (DMSO) i sterkt basisk miljø (Figur 1-8):



**Figur 5-8:** Metylering av hydroksylsyregrupper (Inngjerdingen, 2000).

##### Utstyr

Brand Transferpettor 50-200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

MS2 Minishake IKA®

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med nitrogengass

Ristestativ: Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)

Agatmorter

Whirlimixer (Fisons)

Sentrifuge: MSE bordmodell

Ultralydbad

Vifteovn/varmeskap

### **Reagenser**

Vannfri metanol (Merck)

Dimetylsulfoksid (DMSO) (Merck)

NaOH-pellets, tørr (Merck)

Metyljodid (Merck)

100 mg/ml natriumtiosulfat (Merck) i destillert vann

Kloroform (Prolabo)

### **Prosedyre**

1. Frysetørket prøve fra metode 5.4.1.1 ble dehydrert ved tilsetning av 200 µl vannfri metanol og deretter tørket under nitrogengass.
2. 500 µl DMSO ble tilsatt prøven og ristet i 20 minutter ved ca 200 rpm for å løse sukrene. Dårlig løselige prøver ble sonikert på ultralydbad.
3. NaOH-pellets ble revet med DMSO i agatmorter til konsentrasjonen var ca 120 mg/ml.
4. 500 µl DMSO/NaOH-suspensjon ble tilsatt det løste sukkeret med SMI-pipette uten å berøre glassveggene.
5. Røret ble flushet med nitrogen, og korken skrudd til. Prøven ble deretter ristet i ca 30 minutter ved 200 rpm.
6. 100 µl metyljodid ble tilsatt prøven før risting i 10 minutter ved 200 rpm.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. 200 µl metyljodid ble tilsatt og prøven ble ristet ved 200 rpm i 20 minutter.
9. Prøven ble tilsatt 2 ml kloroform og 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat i vann før grundig miksing og sentrifugering.
10. Øvre fase (vannfasen) ble fjernet
11. Kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml vann. Den ble blandet godt og sentrifugert hver gang før dekantering av vannfase med en glasspipette.

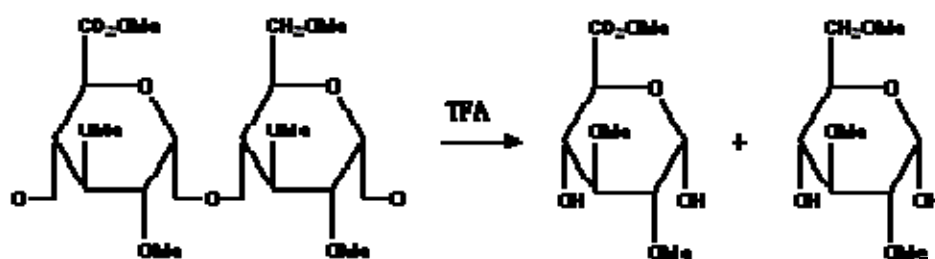
12. Den gjenværende kloroformfasen ble tørket under nitrogengass

#### 5.4.1.3. Hydrolyse

##### Prinsipp

(Kim og Carpita, 1992)

Metylerede polysakkarider spaltes til delvis metylerede monosakkarider ved hydrolyse i surt miljø (Figur 5-9).



Figur 5-9: Hydrolyse av metylerede polysakkarider med TFA (Inngjerdingen, 2000)

##### Utstyr

Varmeenhet til tørking under nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Varmeskap: Function Line, Heraeus Instruments

##### Reagenser

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

##### Prosedyre

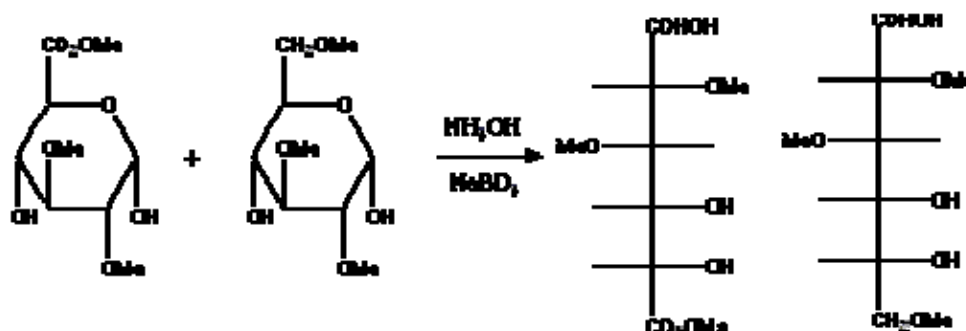
1. Metyleret prøve fra metode 5.4.1.2 ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA og flushet med nitrogengass.
2. Prøver ble inkubert ved 100 °C i 2 timer, deretter avkjølt og dampet til tørrhet med nitrogengass ved 40 °C.

#### 5.4.1.4. Reduksjon

##### Prinsipp

(Kim og Carpita, 1992)

Ringstruktur i monosakkarider brytes ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres til alditol (figur 5-10).



**Figur 5-10:** Reduksjon av karboksylsyre reduserte og metylerte polysakkarider før GC/MS (Inngjerdingen, 2000).

##### Utstyr

Ultralydbad

Varmeskap: Function Line, Heraus Instruments

Varmeenhet til tørking med nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Finn<sup>®</sup>-pipetter<sup>®</sup> (Thermo Labsystems) med spisser

##### Reagenser

2 M NH<sub>3</sub> (Merck)

1 M NaBD<sub>4</sub>, nylaget i 2M NH<sub>3</sub>(Aldrich)

Iseddik (Prolabo)

5 % eddiksyre i metanol

Metanol (Merck)

##### Prosedyre

1. Prøve fra metode 5.4.1.3 ble løst i 500 µl 2 M NH<sub>3</sub> og tilsatt 500 µl nylaget 1 M NaBD<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>3</sub>.
2. Prøven ble sonikert før inkubering ved 60 °C i 1 time.
3. Overskudd av reduktant ble ødelagt ved å tilsette 3 x 50 µl iseddik.

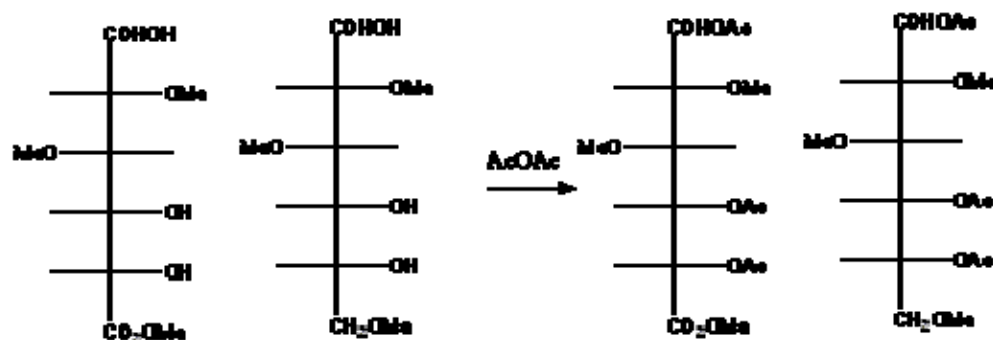
4. Prøven ble tørket under nitrogengass.
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt før tørking under nitrogengass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml metanol ble tilsatt for å fjerne borsyre. Prøvene ble deretter tørket under nitrogengass.
8. Punkt 7 ble gjentatt.

#### 5.4.1.5. Acetylering

##### Prinsipp

(Kim og Carpita, 1992)

Monosakkardine har, etter hydrolyse (metode 5.4.1.3) og reduksjon (metode 5.4.1.4), frie hydroksylgrupper. Disse acetyleres med eddiksyreanhydrid for økt egnethet for gasskromatografisk separasjon (Figur 5-11).



**Figur 5-11:** Acetylering av karboksylsyre reduserte og metylerte polysakkarider før GC/MS med eddiksyreanhydrid, AcOA (Inngjerdingen, 2000).

##### Utstyr

MS2 Minishake IKA®

Ultralydbad

Sentrifuge

Varmeenhet til tørking med nitrogengass

Oppsett til tørking med nitrogengass

Finn®-pipetter® (Thermo Labsystems) med spisser

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Syrevaskede Supelco-rør (4 ml) med teflonbelagt skrukork (PTFE/liner)

### Reagenser

1-metylimidazol (Sigma)

Eddiksyreanhydrid (Merck)

Diklormetan (DCM) (Merck)

Metanol, vannfri (Merck)

Vann

### Prosedyre

1. 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid ble tilsatt redusert prøve fra metode 5.4.1.5.
2. Prøven ble blandet godt, evt sonikert på ultralydbad og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter.
3. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml vann. Prøven ble blandet godt og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter.
4. Delvis metylerte og acetylerede sukker ble ekstrahert med 2 x 1 ml DCM. For hver ekstraksjon ble prøven blandet godt, sentrifugert og DCM-fasen samlet opp.
5. Ekstraktene ble samlet opp og tilbakevasket med 2 x 5 ml vann.
6. DCM-fasen ble overført til et Supelco-rør og tørket under nitrogengass.
7. Prøven ble løst i 50 µl vannfri metanol og analysert ved GC-MS (metode 5.4.1.6)

#### 5.4.1.6. GC-MS

### Prinsipp

(Greibrokk *et al.*, 1998)

Kombinasjonen av gasskromatografi, GC (metode 5.3.1.3), med massespektrometer, MS, som detektor gir strukturinformasjon om analyttene i tillegg til separasjon og kvantifisering. Stoffene elueres på GC-kolonnen, og ledes deretter inn i massespektrometerets ionekilde hvor de vanligvis ioniseres til positive molekyllioner av en elektronstrøm. På grunn av høyt energiinnhold er molekylene ofte ustabile, og vil raskt fragmentere.

GC-MS-analysene ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt.



**Utstyr og betingelser for GC-MS-systemet**

GC-MS: Fisons GC 8065 (Fisons instruments)

Spekteret ble kjørt ved 70 eV

Detektor: Masseselektiv detektor

GC-kolonne: SPB-1 Fused silica

Injektor: Split:splitless

Filmtykkelse: 0,22  $\mu\text{m}$

Indre diameter: 0,2 mm

Lengde: 30 m

Temperaturområde: 80-300  $^{\circ}\text{C}$

Injektortemperatur: 250  $^{\circ}\text{C}$

Viktige ioner: 45, 47, 118, 131, 161, 162, 163, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 305, 307

Temperaturprogram:

80  $^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow[5 \text{ min}]{30 \text{ }^{\circ}\text{C/min}}$  170  $^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow{0,5 \text{ }^{\circ}\text{C/min}}$  200  $^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow[25 \text{ min}]{30 \text{ }^{\circ}\text{C/min}}$  300  $^{\circ}\text{C}$

**Prosedyre**

1. Det ble åpnet for gasstrømmene, GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt med pyridin.

**5.4.2. Enzymatisk degradering****Prinsipp**

(Voragen *et al.*, 2000, Samuelsen *et al.*, 1996)

Enzymatisk degradering ved å bruke spesifikke enzymer er en viktig metode for å undersøke mer om polysakkaridenes struktur og deres biologiske aktivitet. Planter i seg selv inneholder endogene enzymer som spiller en rolle i modningsprosessen. Ved enzymatisk degradering brukes det ofte exogene enzymer med spesifikke egenskaper produsert av mikroorganismer.

Enzymene kan f.eks brukes til å spalte av arabinose og galaktose i surt miljø. De avspaltede molekylene (LMW) kan så skilles fra resten av forbindelsen ved gelfiltrering (HMW) på PD10-kolonne (metode 5.2.4.2) for videre undersøkelser.

### **Utstyr**

Syrevaskede Supelco-rør

Magnet og magnetrører

pH-papir

Millex<sup>®</sup> AA Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm (Millipore)

NOVASPEC<sup>™</sup> (LKB BIOCHROM)

Whirlimixer (Fisons)

### **Reagenser**

50 mM natriumacetatbuffer (pH = 4,0)

α-ARABINOFURANOSIDASE B, Ara-B-4002 (Megazyme)

β-GALACTOSIDASE (A. niger) 8000 U; 112 U/mg; 4000 U/ml in 3.2 M ammonium sulphate (Megazyme)

### **Prosedyre for enzymdegradering med α-arabinofuranosidase B**

1. 14.6 mg frysetørket prøvemateriale ble løst i 3 ml 50 mM natriumacetatbuffer i supelco-rør.
2. Prøven ble tilsatt 30 µl α-arabinofuranosidase B, mikset godt og deretter satt i varmeskap på 40 °C i 72 timer.
3. Etter 36 timer ble det tilsatt 9 µl av enzymet til prøven.
4. Løsningen ble brakt til koking for denaturering av enzym
5. Etter avkjøling ble supernatanten filtrert (0,45 µm) og applisert på PD-10-kolonne (metode 5.2.4.2). Karbohydratelueringprofil ble bestemt ved hjelp av FS-testen (metode 5.3.3).
6. Prøvesubstansene ble frysetørket og undersøkt for komplementfikserende aktivitet med metode 5.5.2 og karbohydratsammensetning og struktur ble undersøkt ved henholdsvis metode 5.3.1 og metode 5.4.1. I tillegg ble molekylvekt undersøkt vha metode 5.3.2.2.

### **Prosedyre for enzymdegradering med $\alpha$ -arabinofuranosidase B og $\beta$ -galactosidase**

1. 19,6 mg frysetørket prøvemateriale ble løst i 4 ml 50 mM natriumacetatbuffer i supelco-rør.
2. Prøven ble tilsatt 40  $\mu$ l  $\alpha$ -arabinofuranosidase B og 200  $\mu$ l  $\beta$ -galactosidase, mikset godt og deretter satt i varmeskap på 40 °C i 72 timer.
3. Etter 36 timer ble prøven tilsatt 12  $\mu$ l  $\alpha$ -arabinofuranosidase.
4. Løsningen ble brakt til koking for denaturering av enzym.
5. Etter avkjøling ble supernatanten filtrert (0,45  $\mu$ m) og applisert på PD-10-kolonne (metode 5.2.4.2). Karbohydratelueringprofil ble bestemt ved hjelp av FS-testen (metode 5.3.3).
6. Prøven ble deretter frysetørket og undersøkt for komplementfikserende aktivitet ved metode 5.5.2 og karbohydratsammensetning og struktur ble undersøkt ved henholdsvis metode 5.3.1 og 5.4.1. I tillegg ble molekylvekt undersøkt vha metode 5.3.2.2.

## ***5.5. Immunmodulerende aktivitet***

### **5.5.1. Tillaging av serum til komplementfikseringstest**

Komplementkilde som brukes i komplementfikseringstesten er å finne i serum fra friske, normale personer.

#### **Utstyr**

Sentrifuge, Christ type 901

Vacutainer rør 10 ml 16 x 10 mm

#### **Prosedyre**

1. Det ble tappet 6 ml blod i et tørt rør.
2. Blodet ble satt til henstand i 2 timer for å koagulere.
3. Når tilstrekkelig koagel var blitt dannet, ble fullblodet sentrifugert i 5-10 min ved ca 1000 x g. Serum ble skilt fra blodcellene.
4. Det ubehandlede serumet ble frosset ned i egnede porsjonsstørrelser ved -70 °C.

## 5.5.2. Komplementfikseringstest

### Prinsipp

(Wagner *et al.*, 1999, Michaelsen *et al.*, 2000, Parham, 2005)

Komplementfikseringstesten er en immunologisk metode som opprinnelig ble utviklet for indirekte å måle nivå av antistoff mot et patogen som fører til komplementaktivering som følge av dannelse av immunkomplekser. Testen brukes derfor til å påvise en pågående eller nylig gjennomgått infeksjon i kroppen, der mikrobepesifikke antistoffer vil aktivere komplementsystemet.

Det som måles er en reduksjon av hemolysegrad av sensitiviserte antistoffdekkede røde blodceller fra sau (SRBC). Humant komplement reagerer med immunkomplekser av SRBC og antistoff fra kanin, dermed aktiveres komplementkaskaden via den klassiske aktiveringsveien og fører til lysering av erytrocyttene. Polysakkarider fra prøver får anledning til å interagere med det humane komplementet før blodcellene tilsettes. Både inhibering og aktivering av komplementsystemet vil i denne testen medføre lavere lyseringsgrad i indikatorsystemet. Det er derfor ikke mulig for en enkelt prøve å slå fast hvilken mekanisme som er dominerende. Men, med en modifisering av testen ved å observere forskjell i aktivitet med og uten preinkubering er det mulig å skille mellom komplementaktivering og inhibering.

### Reagenser

0,9 % NaCl (Merck)

Vann

Veronal/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)  
30 % og 0,02 % natriumazid

Saueblod: Nylig tappet fra Dalasau på Bygdøy

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor: blue 20.06.06  
Fortynnet 1:10 veronalbuffer

Komplementkilde: 2, 5, 6, 8, 11

Standard: *Plantago major* L, fraksjon II (PMII)

### Utstyr

Sentrifuge: CP centrifuge (Beckmann)

GLC-4, General Laboratory Centrifuge (SORVAL®)

Varmeskap med ristepate: Termaks, 37 °C  
Plastpipetter  
Mikrotiterplater: 96 brønner med rund og flat bunn (NUNC™  
MICROWELL PLATE/ NUNC™:NUNCLON™ surface)  
Mikroplateleser: Thermomax  
Whirlimixer (Fisons)  
Finn®-pipetter med spisser

### Prosedyre

#### A: Vasking av saueblodceller

1. 100 µl sedimenterte blodceller per plate ble tatt ut uten å slemme opp blodet.
2. Blodcellene ble vasket to ganger 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet.

#### B: Sensibilisering av saueblodceller

1. Før saueblodcellene benyttes blir de oppbevart i kjøleskap i 1-2 uker for å øke følsomheten. Saueblodet har en holdbarhet på opptil 3 måneder.
2. 5,3 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt 15 µl Virion 9020 Amboceptor og 60 µl vaskede blodceller.
3. Blandingene ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
4. Blodet ble vasket to ganger med 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet.
5. 5,9 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt.
6. Suspensjonen ble alltid benyttet samme dag som tillagingen.

#### C: Fortynning av prøver

1. Ca 1 mg frysetørket prøve ble løst i veronal/BSA-buffer til en 1 mg/ml-løsning
2. En fortynningsrekke ble laget (Tabell 5-2):

**Tabell 5-2:** Fortynningsrekke for prøver og standard

Rør #	Konsentrasjon (µg/ml)		
1	500	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl av stamløsning
2	250	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 1
3	125	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 2
4	62,5	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 3
5	31,3	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 4
6	15,6	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 5
7	7,8	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 6
8	3,9	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 7
9	2,0	300 µl veronal/BSA-buffer	300 µl fra rør 8

## D: Titreringskurve for komplementkilde

- 12 brønner i en rundbunnet mikrotiterplate ble tilsatt 100 µl vann og 32 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer.
- Komplement ble fortynnet med veronal/BSA-buffer som vist i Tabell 5-3 og 50 µl av blandningene ble tilsatt brønnene (4 paralleller av hver fortynning).

**Tabell 5-3:** Titreringskurve for komplementkilde

Komplement:buffer	Komplement (µl)	Veronal/BSA-buffer (µl)
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

- Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
- Det ble tilsatt 50 µl 1 % SRBC i alle brønnene og platen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
- Platen ble sentrifugert og 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering.
- Absorbans ble avlest ved 405 nm.
- Den fortynning som ga 50% lyse av SRBC ble brukt til utføring av komplementtesten.

**E: Utføring av test**

1. 50 µl av hver fortynning av prøven (2 paralleller av hver fortynning) ble tilsatt en rundbundet mikrotiterplate med 96 brønner.
2. Det ble tilsatt 100 µl vann i 4 brønner for 100 % lysekontroll og 4 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer.
3. Komplement ble tatt rett opp av fryseren. 50 µl av den fortynning som genererer 50% lyse ble tilsatt alle brønner, bortsett fra de med vann.
4. Platen ble tildekket med bred blank tape slik at ikke noe kunne fordampe, og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn og platen ble deretter inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platene ble sentrifugert ved ca 1000 x g i 5 min før 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering.
7. Absorbans ble målt ved 405 nm på Microplate Reader.

**F: Beregning**

Lyseringsgrad som tar høyde for komplementets egenpåvirkning ble beregnet ut fra formelen:

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{A_{\text{kontroll}}}{A_{\text{vann}}} \times 100 \%$$

Inhiberingsgrad for prøvene ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\% \text{ inhibering} = \frac{A_{\text{kontroll}} - A_{\text{prøve}}}{A_{\text{kontroll}}} \times 100 \%$$

**5.5.3. Preinkubering og ikke-preinkubering av testprøvene og komplementkilden****Prinsipp**

Metoden, basert på en artikkel av Alban *et al.* (2002), går ut på å undersøke om testsubstansens inkuberingstid med komplementet har noe å si for komplementfikseringsevnen for å kunne skille mellom komplementinhibering eller komplementaktivering. Komplementaktivering gir et forbruk av komplement, mens en

interaksjon med enkelte komplementfaktorer kan gi hemming eller inaktivering av komponenten. Å måle hemolyseinhivering etter 0,15, 30, 45, 60 og 90 minutter og deretter sammenligne resultatene, vil derfor kunne gi oss mer kunnskap om hvilke mekanismer som ligger bak testsubstansenes komplementfikserende evne. I testen ble det også brukt kontrollsystemer med kjente virkningsmekanismer, Aggregert IgG ( $\Delta$ IgG), Zymosan A og Heparin.  $\Delta$ IgG er en komplementaktivator for den klassiske vei, Zymosan aktiverer alternativ vei, mens Heparin er en komplementinhibitor.

Det henvises til metode 5.5.2 for utføring av selve testen.

#### 5.5.4. Måling av NO-frigjøring fra makrofager

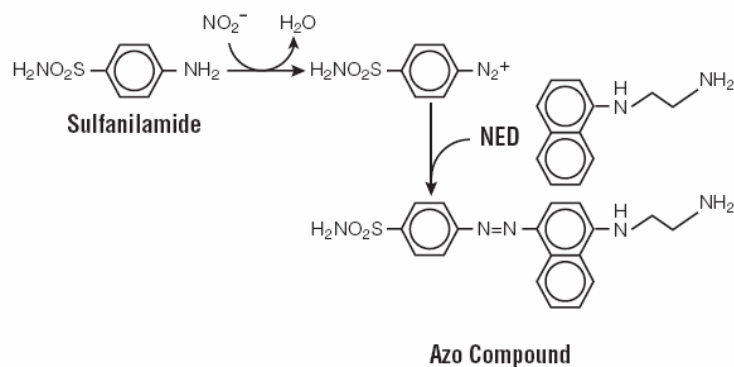
Denne testen ble utført av Marit Inngjerdingen ved Det medisinske fakultet, Avdeling for Anatomi.

##### **Prinsipp**

(PromegaCorporation, 2005)

Ved aktivering utskiller makrofager nitrogenoksid (NO) og en rekke andre mediatorer som bidrar til immunresponsen. NO brytes ned til to produkter, et av disse er den stabile og ikke-flyktige forbindelsen nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) som har vist seg velegnet som et mål på makrofagaktivitet. Griess-reagenssystemet baserer seg på den kjemiske reaksjonen vist i Figur 5-12, der nitritt reagerer med sulfanilamid og N-(1-naftyl)etylendiamin (NED) i surt miljø. Azo-forbindelsen som dannes farger løsningen rosa og konsentrasjon kan avleses ved absorbansmåling. Griess-reagenssystemet er i stand til å detektere nitritt i en mengde forskjellig væskematrikser, inkludert plasma, serum, urin og cellekulturmedium.





**Figur 5-12:** Kjemiske reaksjoner involvert i  $\text{NO}_2^-$ -måling i Griess-reagenssystemet. Måling gjøres ved 540 nm (Promega Corporation, 2005).

### Reagenser

- Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2mM L-glutamin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoetanol
- Griess-reagens A: 1 % Sulfanilamid (Sigma S-9251)
- Griess-reagens B: 0,1 % N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) (Sigma N-9125)  
2.5 % fosforsyre
- Cellelinje: R2-makrofager derivert fra rottemakrofager

### Utstyr

- Celleteller: CoulterCounter
- Sentrifuge: Beckman Rotanta 460R
- Flatbunnet mikrotiterplate
- Absorbansmåler: Titertek Multiskan

### Prosedyre

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. 20  $\mu\text{l}$  celleduspensjon ble tilsatt 10 ml PBS og cellene talt i en cellteller. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 min.
2. Cellene ble resuspendert til  $10^6$  celler/ml i dyrkningsmedium.
3. Celler ble stimulert i flatbunnet mikrotiterplate og tilsatt 50  $\mu\text{l}$  celleduspensjon ( $5 \times 10^4$  celler) per brønn.
4. 50  $\mu\text{l}$  pektinekstrakt ble tilsatt hver brønn.
5. Fortynningskurve med 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  og 0,1  $\mu\text{g/ml}$  pektinekstrakt ble laget.
6. Celler ble inkubert over natt ved 37 °C.

7. 100  $\mu$ l av supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1300 rpm i 2 min.
8. 50  $\mu$ l av supernatanten ble overført til rundbundet mikrotiterplate.
9. Fortynningsrekke av  $\text{NaNO}_3$  ble laget med 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M og 0  $\mu$ M konsentrasjon
10. 50  $\mu$ l Griess-reagens A ble tilsatt.
11. Prøvene ble satt til henstand 10 minutter ved romtemperatur i mørke.
12. 50  $\mu$ l Griess-reagens B ble tilsatt.
13. Absorbans ble målt ved 540 nm.

## 6. Resultater og diskusjon

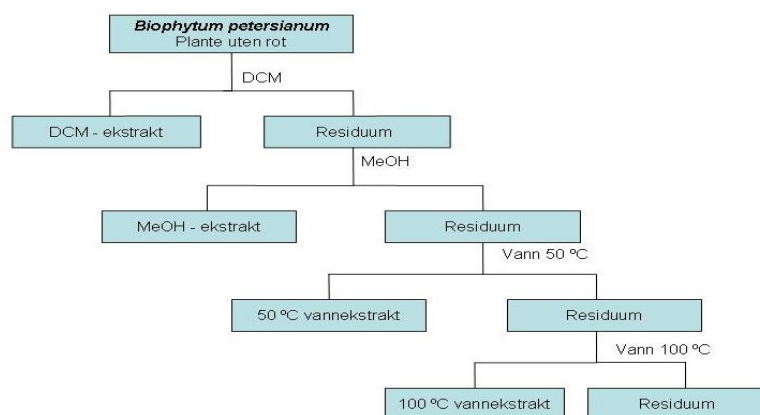
### 6.1. Sammenligningsgrunnlag

Alle resultatene sammenlignes med tidligere utført arbeid, særlig det som er gjort av Inngjerdingen i 2002-2006 på *B. petersianum*. I tillegg vil metoder, strukturlikheter og immunmodulerende aktivitet sammenlignes med tilsvarende arbeide utført på polysakkarider.

### 6.2. Isolering av polysakkarider

#### 6.2.1. Ekstraksjon

Utgangspunktet for ekstraksjon var 350 g tørket og pulverisert plante uten rot av *B. petersianum* som ble samlet og identifisert av professor Drissa Diallo, i Blendio, Mali i november 2002. Materialet ble først ekstrahert med diklormetan (DCM), deretter metanol (MeOH) for å fjerne lavmolekylære og lipofile substanser i planten. Til slutt ble materialet ekstrahert med først 50 °C og så 100 °C varmt vann. Sistnevnte ble valgt for videre studier, da tidligere forsøk har vist liten biologisk aktivitet i 50 °C vannekstrakt (Inngjerdingen *et al.*, 2006). Det ble likevel tatt vare på, og ekstraktet ble kalt BPCrude50°C (BPC50). Vannekstraktet ble kalt BPCrude100°C (BPC100). Ekstraksjonsprosessen er illustrert i Figur 6-1. BPC100 ble dampet inn på rotavapor, dialysert mot vann og videreført til gelfiltrering, og dermed ikke frysetørket og veid.

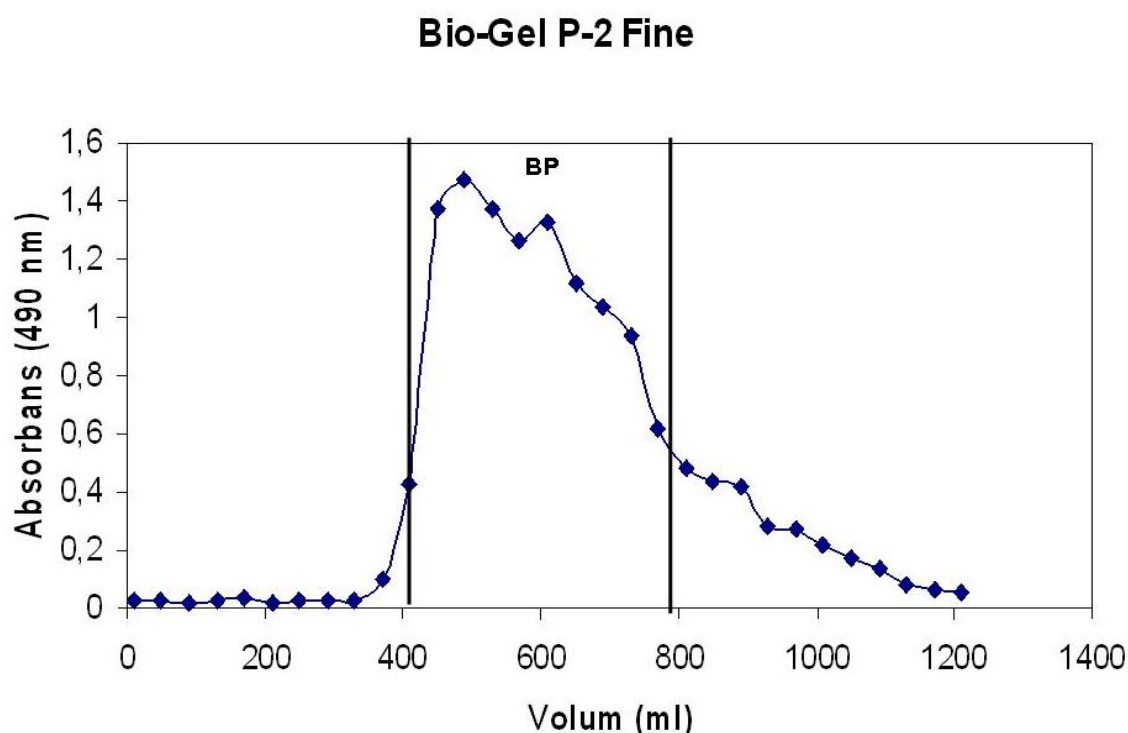


**Figur 6-1:** Flytdiagram for preparering av vannekstrakt

### 6.2.2. Gelfiltrering ved bruk av Bio-Gel® P-2 Fine

Ekstraktene var svært farget og inneholdt lavmolekylære substanser, og ble derfor applisert på Bio-Gel® P-2 Fine-kolonne (metode 5.2.4.1). Kolonnen ble bestemt brukt ettersom Inngjerdingen hadde brukt den på det tilsvarende trinnet med *B. petersianum* i prøveopparbeidelsen (2006). Ved gelfiltrering separeres stoffer etter molekulstørrelse noe som medfører at salter og andre lavmolekylære, gjerne fargede forbindelser, kan skilles fra de høymolekylære (HMW) polysakkaridene.

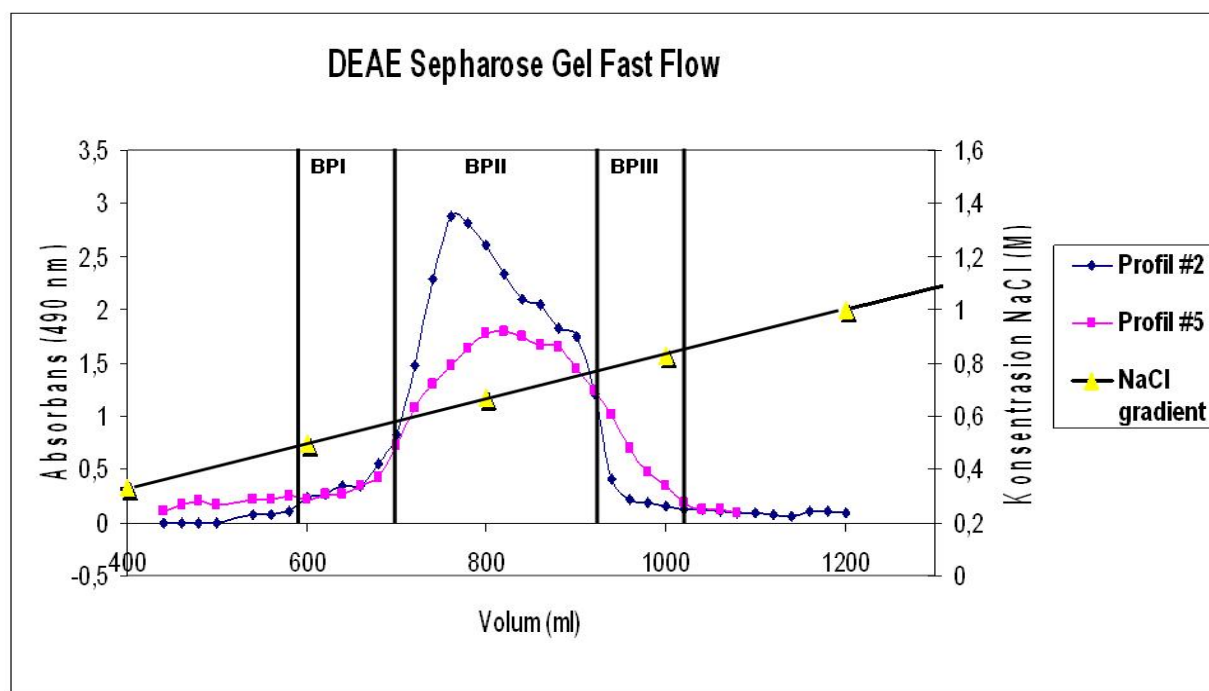
Fraksjoner inneholdende HMW karbohydrater, bestemt ved fenolsvovelsyretest (FS-test), ble slått sammen til BP (betegnelsen BP tilsvarer BP100 i Inngjerdingen *et al.*, 2006). Et eksempel på karbohydratelueringprofil for BP vises i Figur 6-2. Fraksjonen med HMW karbohydrater viste en sterk gulfarge ved FS-testen. Kurven hadde også en hale på høyre side og dette kan tyde på en forekomst av monosakkarider som det var ønskelig å separere fra (Figur 6-2). BP ble så overført til ionebytterkolonne etter en volumreduksjon på rotavapor.



**Figur 6-2:** Karbohydratelueringprofil for 100 ml påsatt BPC100 eluert med vann på Bio-Gel® P-2Fine (kolonnevolum = 1000 ml) målt ved 490 nm etter FS-test. Området mellom linjene ble slått sammen til BP.

### 6.2.3. Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose® Fast Flow/ ANX Sepharose Fast Flow

BP ble applisert på DEAE/ANX Sepharose® Fast Flow ionebytterkolonne (metode 5.2.5.1) for å separere nøytrale fra sure polysakkarider. Til sammen 3 liter gelfiltrert materiale ble påsatt kolonnen, ca 200 ml av gangen. Årsaken til den store mengden med prøvemateriale etter gelfiltrering kom av at ekstraktets viskositet ikke gjorde det mulig å oppkonsentrere ytterligere. Nøytrale polysakkarider ble først eluert ut med destillert vann og ikke tatt vare på ettersom tidligere forsøk har vist liten immunmodulerende aktivitet i nøytrale fraksjoner (Inngjerdingen *et al.*, 2006). Sure polysakkarider ble eluert ut etter økende surhetsgrad ved hjelp av en NaCl-gradient fra 0 til 1,5 M. Karbohydratelueringprofilen ga grunnlag for å dele opp eluatet i tre fraksjoner, BPI, BPII, og BPIII (Figur 6-3).



**Figur 6-3:** Karbohydratelueringprofilen til BP på DEAE Sepharose® Fast Flow (kolonnevolum ca 500 ml) eluert med en NaCl – gradient. Kjøring nr 2 og 5 presenteres i figuren og absorbansen er målt ved 490 nm etter behandling av prøver av fraksjonene med fenolsvovelsyre. Områdene som inneholdt karbohydrater ble inndelt i BPI, BPII og BPIII. Lignende profil fåes ved eluering med ANX.

Kolonnen ble til slutt eluert med 2M NaCl, og det ble foretatt en FS-test av eluatet som ga negativt utslag. Dette tyder på at de sure fraksjonene BPI, BPII og BPIII inneholdt hovedandelen karbohydrater. FS-test ga sterkt utslag av sure karbohydrater. Tabell 6-1

viser utbyttet av de tre fraksjonene etter dialyse og frysetørking. Det frysetørkede materialet ga BPI en lys gul farge, BP II gulhvitt, og BP III et brunt materiale.

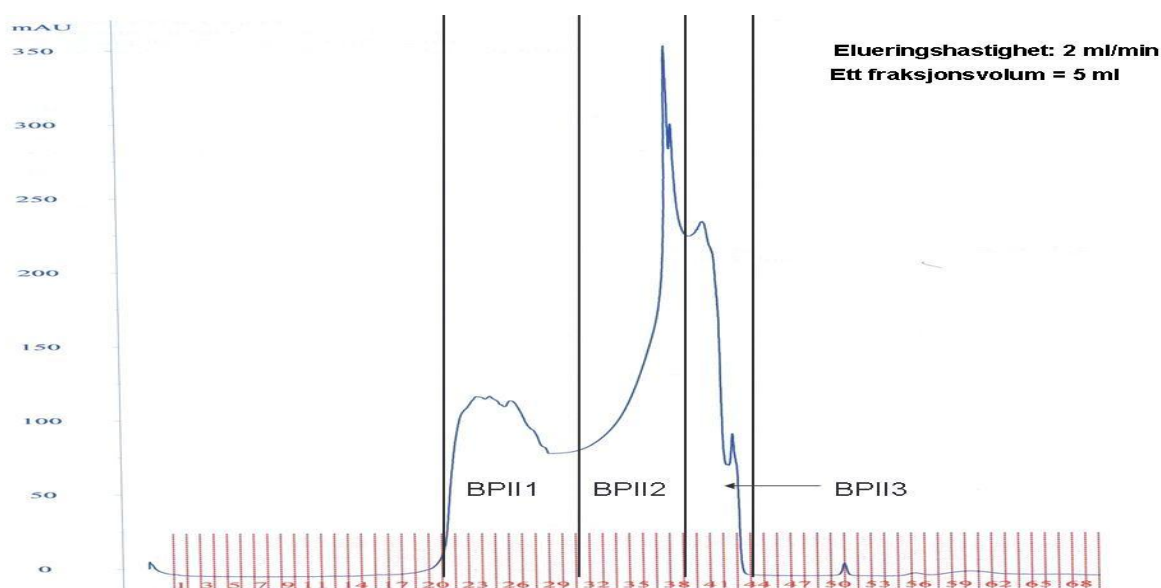
**Tabell 6-1:** Utbytte av de ionebyttede fraksjonene etter dialyse og frysetørking

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
BPI	118	0,034%
BP II	1534	0,44%
BP III	126	0,036%

Pga store mengder med materiale ble kun halvparten av det ionebyttede ekstraktet frysetørket. Frysetørket utbytte i forhold til utgangsmaterialet på 350g blir derfor 0,51%. Monosakkaridsammensetningen til BPI, BP II og BP III ble bestemt vha metanolyse og påfølgende TMS-derivatisering og GC (monosakkaridanalyse, 6.3.1.).

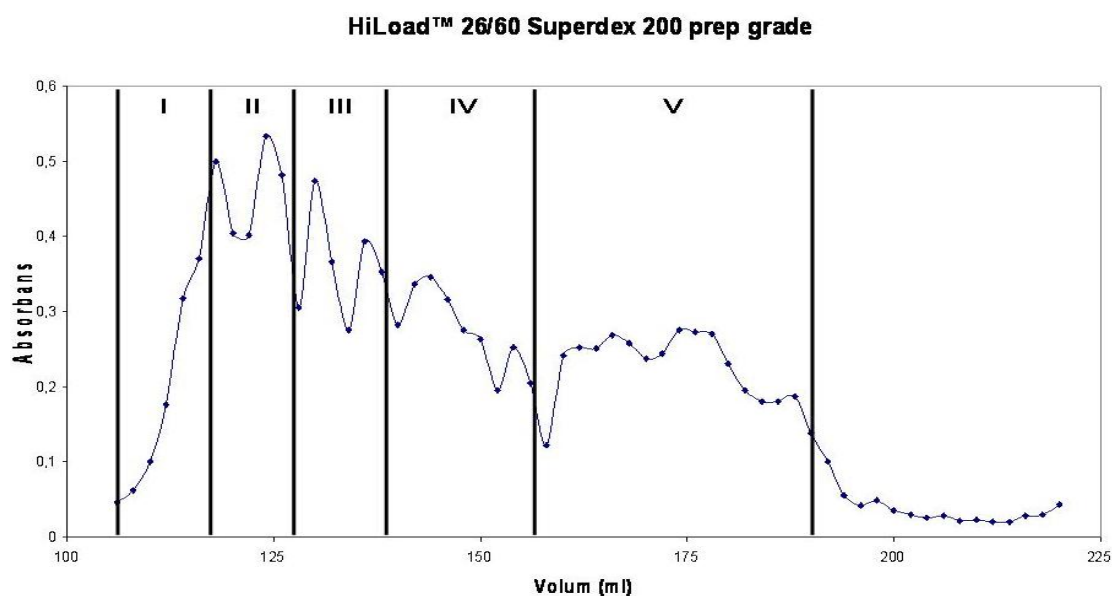
#### 6.2.4. Gelfiltrering med HiLoad™ 26/60 Superdex 200 prep grade

Tidligere arbeid har vist høy immunmodulerende aktivitet hos BP II, men ikke hos BPI og BP III (BP II tilsvarer BP100 III, Inngjerdingen *et al.*, 2006). Derfor fortsatte arbeidet herfra kun med BP II. Metanolyse av BP II viste forurensninger og ytterligere separasjon og fraksjonering ble foretatt på en HiLoad™ 26/60 Superdex 200 preparativ gelfiltreringskolonne som separerer forbindelser i området 10 – 600 kDa. Som Figur 6-4 viser stiger kurven brått etter 100 ml som tyder på at BP II ble eluert ut med ”void volume”, eksklusjonsvolumet ( $V_0$ ) som er 105 ml (Figur 6-4). Det medfører at forbindelsene har for stor molekylvekt til å kunne bli separert. FS-test viste karbohydratinnhold i BP II1. BP II2 og BP II3 ble eluert ut sent, og FS-test bekreftet lavmolekylære substanser uten tegn til karbohydrater. BP II1 var derfor den eneste fraksjonen som ble tatt vare på videre herfra.



**Figur 6-4:** Karbohydratelueringprofil av BPII på Superdex 200 koblet til FPLC-apparatur. Prøvematerialet er eluert med vann. Kolonnevolumet er 319 ml Områdene mellom linjene ble samlet til BPII1, BPII2 og BPII3. Y-aksen viser absorbans målt ved 214 nm og X-aksen viser fraksjonsnummer.

Ekstraktene ga tilnærmet fargeløst materiale. Utbyttet av BPII1 etter separasjon av 600mg BP på Superdex 200 og påfølgende frysetørking ga 369 mg. Dette tilsvarer 0,11% av opprinnelig plantemateriale. BPII1 ble etter vurdering av dens elueringsprofil (Figur 6-4) antatt å være en heterogen samling av karbohydrater. 350 mg av BPII1 ble derfor kjørt på Superdex en gang til (Figur 6-5). Tidligere molekylvektsbestemmelser av *B. petersianum* var bakgrunnen for valg av separasjon av fraksjoner ytterligere en gang på samme kolonne.



**Figur 6-5:** BPII ble fraksjonert opp i 2 ml per rør vha Superdex 200 der prøvematerialet ble eluert med vann. FS- testen ga en karbohydratelueringprofil som muliggjorde deling av BPII inn i fem fraksjoner. Absorbansen ble målt ved 490 nm. Figuren viser en av tre elueringsprofiler og er representativ.

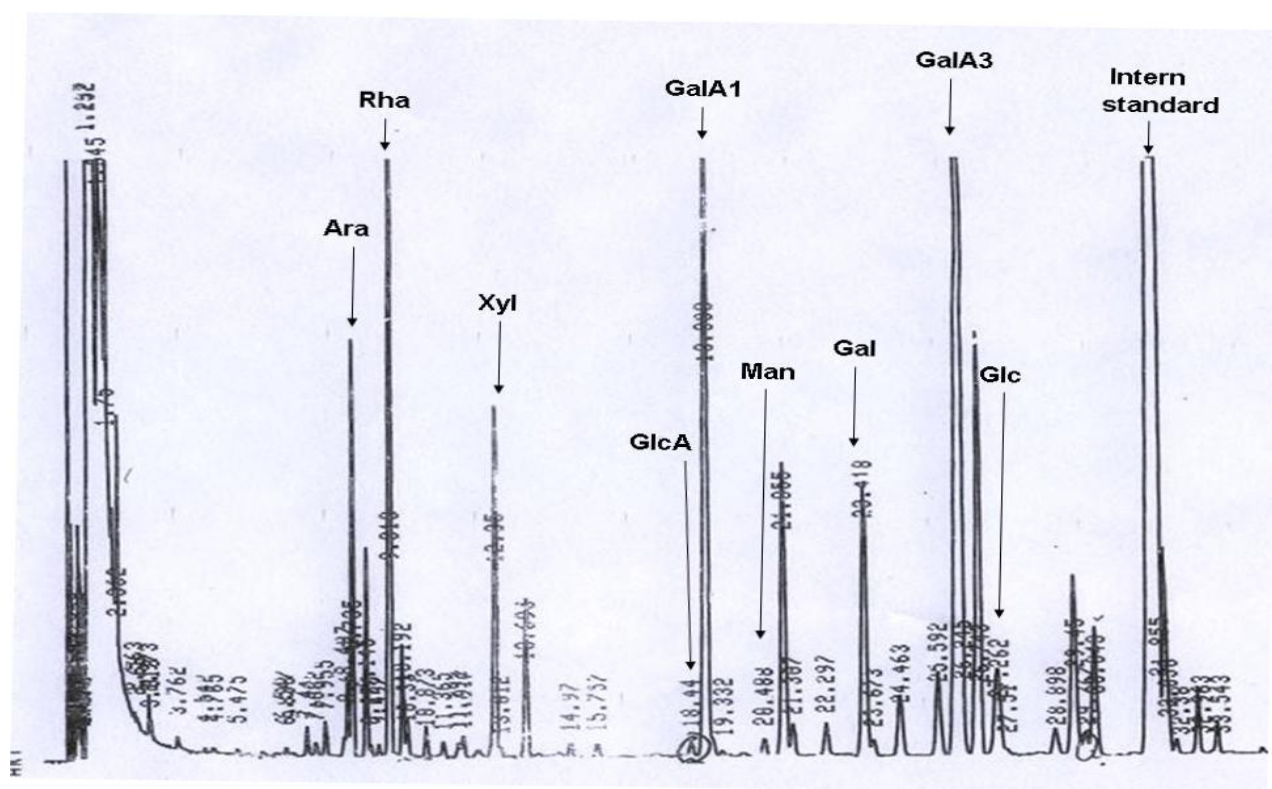
BPII1 ble inndelt i 5 fraksjoner, BPII1-I, BPII1-II, BPII1-III, BPII1-IV og BPII1-V. Fraksjon BPII1-I ga en bratt kurve som kan tyde på at den ble eluert ut med  $V_0$ . Valget av kolonne var derfor ikke optimalt. Utbyttet av de 5 fraksjonene etter frysetørking presenteres i Tabell 6-2.

**Tabell 6-2:** Utbytte av karbohydrater etter separasjon på gelfiltreringskolonne Superdex 200

Fraksjon	Utbytte (mg)
BPII1-I	17,8
BPII1-II	44,7
BPII1-III	67,5
BPII1-IV	92,7
BPII1-V	37,1

### 6.3. Karbohydratanalyse

#### 6.3.1. Monosakkaridanalyse



**Figur 6-6:** Eksempel på GC-kromatogram. Her vises en monosakkaridbestemmelse av BPII. Karakteristiske toppar for forskjellige monosakkarider er avmerket. Internstandard er mannitol.

Karbohydratsammensetningen av fraksjoner fra ionebytterkromatografi på DEAE/ANX Sepharose Fast Flow og gelfiltrering på Superdex 200 ble bestemt ved metanolyse etterfulgt av TMS-derivatisering og GC-analyse. Hvert monosakkarid finnes i to eller



flere konformasjoner og vil av den grunn kunne gi opphav til flere topper i kromatogrammet som danner monosakkaridspesifikke mønster. Figur 6-6 viser et kromatogram for monosakkaridbestemmelse av BPII der karakteristiske topper som ble brukt for kvantifisering av de forskjellige monosakkarider er avmerket.

**Tabell 6-3:** Resultater fra GC presenteres i tabellen. Karbohydratsammensetning av ekstrakter etter ionebytter og gelfiltrering (Superdex 200). Verdiene er oppgitt som prosent av totalt karbohydratinnhold. <sup>a</sup>n.d. = not detected

	BPI	BPII	BPIII	BPII1	BPII1-I	BPII1-II	BPII1-III
<b>Ara</b>	9,8	5,5	5,8	6,4	6,8	6,2	5,9
<b>Rha</b>	4,3	8,8	9,0	6	10,5	9,9	10,4
<b>Fuc</b>	1,4	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	spor	spor	spor	spor
<b>Xyl</b>	15,6	6,3	6,0	5,9	8,7	7,6	7,4
<b>Man</b>	4,0	0,4	3,7	0,8	0,7	0,5	0,5
<b>Gal</b>	14,0	8,6	16,9	4,8	10,4	10,4	9,4
<b>Glc</b>	5,8	3,3	8,5	13,1	5,2	5,9	5,6
<b>GlcA</b>	13,3	1,9	n.d.	n.d.	2,5	3,3	3,7
<b>GlcA-3</b>	11,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>4-O-Me-GlcA</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	spor	spor	spor
<b>GalA</b>	20,5	65,2	50,2	60	57,0	56,2	57,1
<b>% karbohydrater i prøvematerialet</b>	97,4%	49,9%	64,4%	35,6%	36,5%	100,2%	49,5%

Tabell 6-3 viser karbohydratsammensetningen av ekstrakter fra ionebytterkolonne på DEAE/ANX; BPI, BPII og BPIII, samt fra gelfiltrering på Superdex 200; BPII1, BPII1-I, BPII1-II og BPII1-III. Monosakkaridsammensetningen er typisk for pektiner, og de inneholder hovedsakelig GalA (unntatt BPI) og nesten like mengder Ara, Rha og Gal. Forekomst av Rha i tillegg til GalA i alle sure fraksjoner indikerer innhold av rhamnogalakturnonaner (RG). De relativt store mengdene med Xyl er ikke typisk, men har blitt observert i pektiner fra forskjellige planter og er muligens komponent i xylogalakturnonanområder (Pérez *et al.*, 2003). Monosakkaridsammensetningen samsvarer godt med de resultatene Inngjerdingen *et al.* viste i 2006.

BPI er den eneste fraksjonen der fucose ble detektert som mer en bare spormengder. Videre inneholder den mer Ara og GlcA, men mindre Rha og GalA enn de andre fraksjonene. Alle fraksjonene har en høy forekomst av Xyl. Alle fraksjonene unntatt BPI har svært høy mengde av GalA.

Flere av verdiene for totalt karbohydratinhold beregnet ut fra internstandard var svært varierende. Samme undersøkelse med lik prøveopparbeidelse på ekstrakter fra andre planter gjort i tilsvarende tidsrom har også vist svært varierende verdier for totalt sukkerinnhold. Samme internstandard er benyttet i alle prøvene og det mistenkes at de dårlig samsvarende resultatene kan skyldes forandringer i denne standardløsningen. Ny internstandard ble bestemt laget, men BP11-I, BP111-II og BP111-III er gjort med den gamle. Av den grunn ble ikke verdiene for totalt karbohydratinhold av gjeldene fraksjoner tatt hensyn til i oppgaven. Det relative forhold mellom monosakkaridene antas å være riktig og vurderes deretter.

BP11 og BP111 ga lave utbytter på hhv 49,9% og 35,6% monosakkarider i prøven. Årsakene til dette kan være flere. Forurensninger i prøven gir redusert utbytte. Usikkerheter ved selve innveilingen av prøvematerialet er et annet moment. Fenoliske forbindelser kan også forekomme, særlig hos BP11 som ga en noe farget fraksjon. Etter frysetørking og inkuberingstid i eksikator kan prøvene fortsatt ha et vanninnhold på 10% og dette kan være en medvirkende årsak. I tillegg kan den gjenværende massen komme av proteiner og uorganisk materiale (Aslaksen, 2007).

I de tilfeller der uronsyreinnholdet er svært høyt er det nødvendig å bruke en sterkere HCl-konsentrasjon for å at metanolysen skal skje tilstrekkelig. Store mengder uronsyre i prøven kan gi ufullstendig spalting og medføre at totalutbyttet blir for lavt. For BP1, BP11 og BP111 ble det utført metanolyse med både 6M HCl og 4M HCl i vannfri metanol. Ettersom monosakkaridanalysene ikke viste betydelige forskjeller ble det bestemt å kun bruke 4M HCl. Nøytrale polysakkarider inkludert mannitol er mer ustabile i 6M HCl. Degraderingen antas å være stor for f.eks Xyl, som etter metanolyse i 6M HCl 100 °C kun har 16% igjen av opprinnelig mengde (Chambers og Clamp, 1971).

### 6.3.2. Bindingsforhold

Bindingsforhold mellom monosakkaridene i prøvene etter gelfiltrering på Superdex 200 ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon med påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse (metode 5.3.1).

Tabell 6-4 viser fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype. Mengdeforhold ble beregnet ut fra areal under kurven (AUC) i kromatogrammet og total

AUC for alle monosakkarider i hver enkelt prøve. Topper som utgjorde < 1 % av totalinnholdet karbohydrat er utelatt fra tabell og videre diskusjon.

Terminal Glc, GlcA og 4-*O*-Me-GlcA har lik retensjonstid ved GC-MS-analyse. Forholdet mellom Glc og GlcA/4-*O*-Me-GlcA ble bestemt fra forholdet mellom intensiteten av fraksjoneringsstoppene på henholdsvis 205 og 207 i massespekteret. Det samme gjelder terminal Gal og GalA, der en kan bestemme mengdeforholdene mellom intensiteten av hhv 233 og 235 i massespekteret (Tabell 6-4). Dette kommer av at esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte til deutererte primære alkoholer vha NaBD<sub>4</sub>, mens frie uronsyrer aktiveres med carbodiimid (CMC) før reduksjon. Det dannes 6,6-dideuteriosukker som skilles fra nøytrale sukker ved GC-MS-analyser pga annen fragmentmasse ( $M^+ + 2$ ).

**Tabell 6-4:** Fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype for prøver etter gelfiltrering på Superdex 200.. Verdiene er beregnet fra AUC og angis i prosent av total karbohydratmengde i prøven.

		BPII1-I	BPII1-II	BPII1-III
<b>Ara</b>	<b>Terminal</b>	6,55	4,97	4,84
	<b>1,4/5 *</b>	0,25	0,90	0,82
	<b>1,3,5 **</b>		0,24	0,24
<b>Fuc</b>	<b>Terminal</b>	spor	spor	spor
<b>Glc</b>	<b>Terminal</b>		0,84	1,22
	<b>1,4</b>	5,2	5,06	4,38
<b>Rha</b>	<b>Terminal</b>		0,11	0,63
	<b>1,2</b>	7,19	5,41	6,80
	<b>1,3</b>		0,19	
	<b>1,2,3</b>		0,12	
	<b>1,2,4</b>	3,31	4,07	2,96
<b>Gal</b>	<b>Terminal</b>	6,50	5,33	6,09
	<b>1,3</b>	0,87	1,52	1,30
	<b>1,6</b>	2,11	2,20	1,02
	<b>1,3,6</b>	0,92	1,30	0,99
<b>Xyl</b>	<b>Terminal</b>	8,42	7,40	7,18
	<b>1,4</b>	0,28	0,20	0,22
<b>GlcA</b>	<b>Terminal</b>	2,50	0,47	0,80
	<b>4-O-Me-</b>		2,83	2,90
<b>GalA</b>	<b>Terminal</b>	3,68		7,46
	<b>1,4</b>	44,75	49,38	43,46
	<b>1,3,4</b>	7,86	6,38	5,63
	<b>1,2,4</b>	0,71	0,44	0,55

\*Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at dette er 1,5-bundet Ara og ikke 1,4-bundet.

\*\* Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at 1,3,5-bundet Ara har kortere retensjonstid enn 1,2,5-Ara.

Fragmentering av 1,4- og 1,5-bundet Ara gir samme fragmenteringsmønster. Tidligere erfaring har vist at monosakkarider i denne toppen har blitt borte ved svak syrehydrolyse. Dette tyder på at toppen består av 1,5-Ara siden 1,4-Ara ville vært på pyranoseform og dermed langt mer motstandsdyktig mot sur hydrolyse.

Ara bundet 1,2,5 og 1,3,5 retarderes likt ved GC-MS. Tidligere erfaring har gitt grunn til å anta at 1,2,5-Ara retarderes i større grad i GC-systemet og dermed kommer ut etter 1,3,5-Ara. MS gir likevel forskjellig fragmenteringsmønstre og løser i stor grad evt utfordringer ved fortolkning av spekteret.

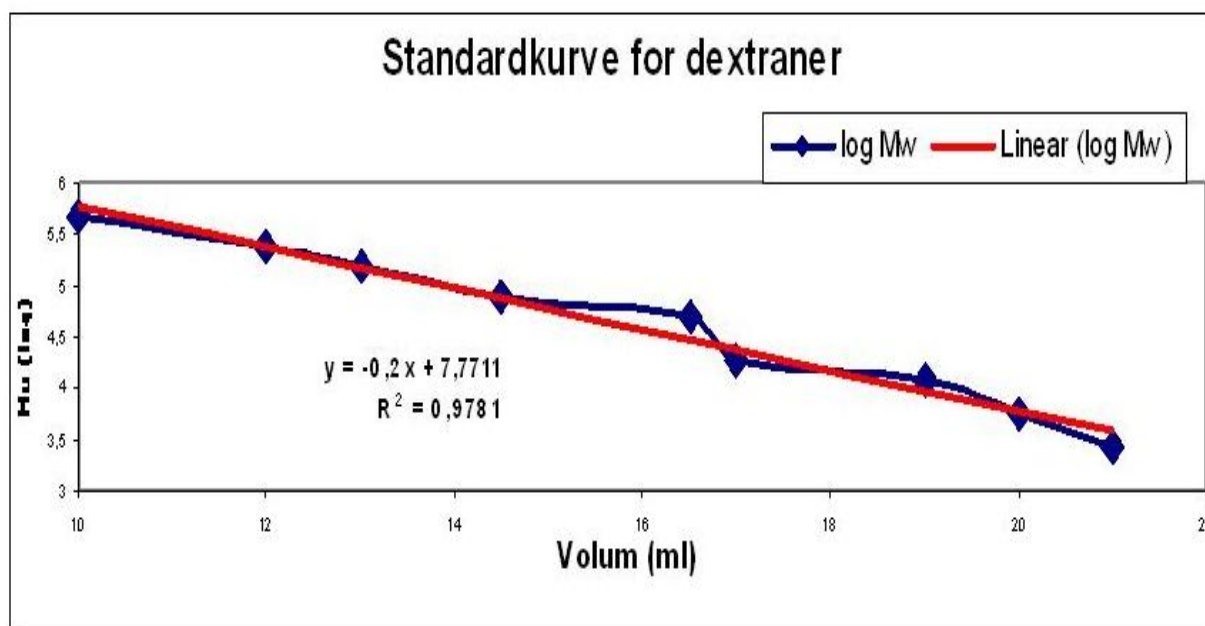
Alle tre fraksjoner inneholdt en høy andel terminale monosakkarider. BPII1-I inneholdt hele 42,6%, mens BPII1-II og BPII1-III inneholder hhv 24,0% og 33,0% terminale monosakkarider. Jo større andel terminale monosakkarider, desto mer forgrenet vil pektinet være. Dette betyr at store deler av polysakkaridene er hårete områder med korte, forgrenede sidekjeder. Forekomst av 1,3-Gal og 1,6-Gal i tillegg til forgrenede Gal-enheter er sammen med terminal og 1,5 bundet Ara er typisk for AGII. Dette sees hos alle fraksjonene. 1,2,4-binding av Rha er typisk for RGI, og dette forgreningspunktet forekommer i en viss grad i alle BP-fraksjonene. 1,4-Gal er vanlig å se i AGI som ikke finnes i noen av prøvene, og dette tyder på at fraksjonene ikke inneholder AGI. Store mengder med forgreningspunkter av GalA er tilstede i alle tre fraksjoner. Tilsvarende mengde finnes av Terminal xylose (XylTp), og det er derfor rimelig å anta at XylTp er bundet til forgreningspunktene i GalA kjeden. Det finnes noe 1,4-bundet Xyl også som kan bety at noe Xyl er bundet som oligosakkarider til HG. Ut ifra disse strukturene er det rimelig å anta at det finnes biter av XG i molekylet. Dette stemmer overrens med de funn Inngjerdningen viste i sine studier (Inngjerdningen, 2007).

BPII1-I viste høyest komplementfikserende aktivitet på komplementsystemet. BPII1-I er den fraksjonen med høyest andel terminale monosakkarider og har dermed høyest grad av forgrening. Det er kjent at hårete områder ofte består av RGI med AGII-sidekjeder. Hårete områder fra rhamnogalakturonaner har vist seg påvirke både den klassiske og den alternative aktiveringsveien i humant komplementsystem (Paulsen og Barsett 2005, Yamada og Kiyohara 1999). Både BPII1-I, BPII1-II og BPII1-III viste høyere aktivitet enn PM II ved komplementfikseringstesten (Komplementfikseringstest, 5.5.2).

Metyleringsanalyser av B2IIc, en sur fraksjon fra *B. falcatum*, viser flere likhetstrekk med *B. petersianum*. Blant annet kan det høye innholdet av 1,4-GalA (ca 57% hos alle tre fraksjoner) gjenkjennes i B2IIc (64,9 %). Dette høye innholdet skyldes trolig homogalakturonanområder (Paulsen og Barsett, 2005).

### 6.3.3. Molekylvektsdistribusjon

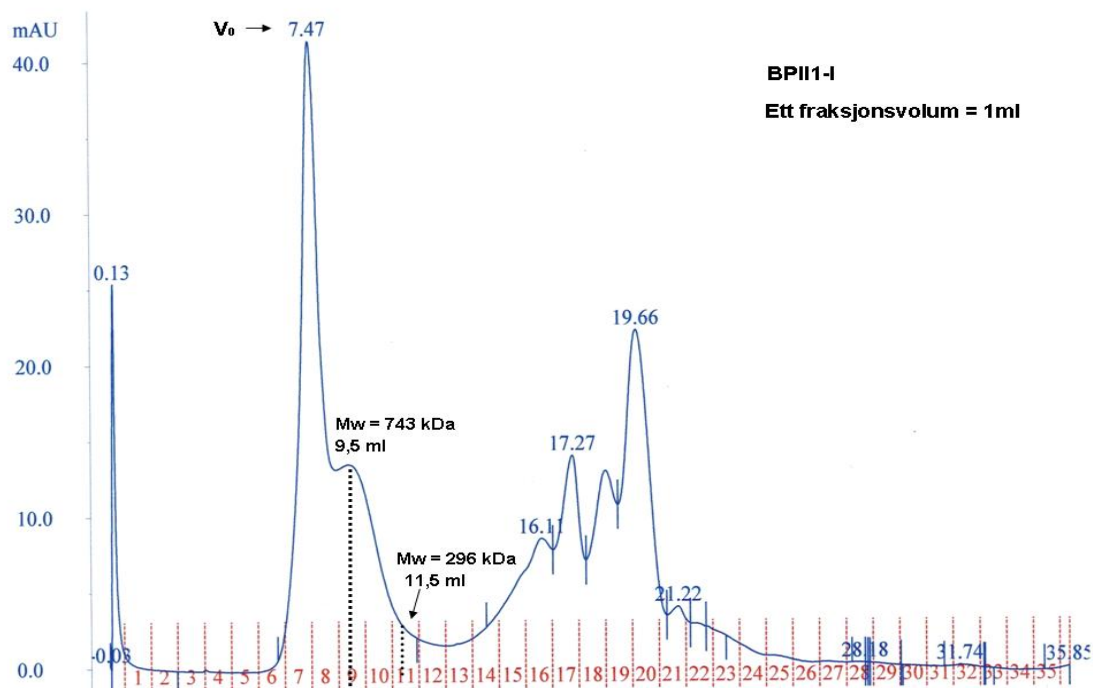
Undersøkelse av molekylvektsdistribusjon ble gjort ved bruk av gelfiltreringskolonnen Superose 6 koblet til FPLC-apparatur. BPII1-I, BPII1-II og BPII1-III ble undersøkt. I tillegg til prøvene ble det kjørt dekstranstandarder med kjent molekylvekt ( $M_w$ ) under samme forhold. Det ble laget en lineær semilogaritmisk standardkurve ut fra toppmaksimum for hvert av dekstranene. Molekylvektsdistribusjon for prøvene ble beregnet ved hjelp av funksjonen ut ifra regresjonslinjen som er beregnet etter resultatene fra kalibreringskurven. Figur 6-7 viser standardkurven og funksjonen for regresjonslinjen. Karbohydratelueringprofilen for dekstranene ble bestemt ved hjelp av FS-testen.



**Figur 6-7:** Standardkurve ved bruk av Superose 6 koblet mot FPLC-apparatur. Dekstraner med  $M_w$  475 kDa, 233 kDa, 150 kDa, 80kDa, 50 kDa, 19 kDa, 11,7 kDa, 5,6 kD og, 2,65 kDa plottet semilogaritmisk mot elueringsvolum til toppmaks.  $V_0$  er 7,8 ml og kolonnevolumet er 23,5 ml. Dextranene ble eluert med 10mM NaCl. Absorbans er målt ved 214 nm.

Til beregning av molekylvektsdistribusjon for prøvene ble kromatogrammene fra UV-detektoren benyttet. I utgangspunktet detekteres kun sure polysakkarider, men ved å redusere bølgelengden, som her til 214 nm, økes sensitiviteten. Dette gjelder også for

andre stoffer tilstede i prøven. Sammenligning med karbohydratelueringprofilen fra FS-testen viste hvilke av toppene i UV-kromatogrammene som gjenspeilet polysakkarider og beregningen ble gjort ut fra dette.

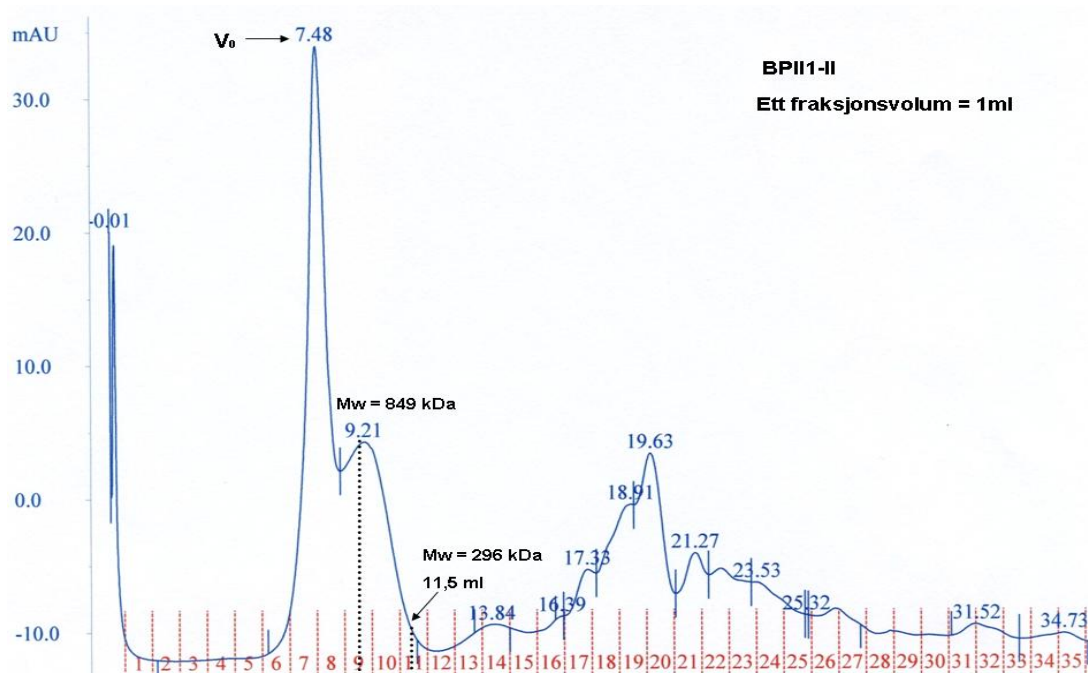


**Figur 6-8:** Kromatogram for BPII1-I kjørt gjennom Superose 6 som er koblet opp mot FPLC. Absorbansen er målt ved 214 nm. Toppmaksimum elueres ut etter 9,5 ml.  $V_0$  er 7,8 ml og kolonnevolumet er 23,5 ml. Elueringsvæsken er 10 mM NaCl.

Kromatogrammet for BPII1-I (Figur 6-8) viser to topper som inneholder karbohydrater. Første topp kommer ut med eksklusjonsvolumet,  $V_0$ , som tyder på at ekstraktet har en høyere Mw enn hva kolonne kan separere. En oppsamling av prøvesubstans er trolig årsaken til at topp ved 7,5 ml er høyere enn topp ved 9,5 ml. Toppmaksimum som det derfor er rimelig å anta at elueres ut etter ca 9,5 ml har en høyere Mw enn noen av dextranstandardene. Molekylvekten antas å distribuere jevnt rundt toppmaksimums molekyllstørrelse; 743 kDa. Resultatene presenteres i Tabell 6-5. På grunn av ingen eller svært dårlig grunnlinjeseparasjon er molekylvekten kun beregnet ut fra toppmaksimum. Toppene etter ca 16 ml viste ved FS-testen ikke å inneholde karbohydrater.

**Tabell 6-5:** Estimert molekylvekt (Mw) i Da ved toppmaksimum for BPII1-I

	Mw (Da)
Høyeste Mw	n.d.
Toppmaksimum, Mw (9,5 ml)	$7,43 \times 10^5$
Laveste Mw (11,5 ml)	$2,96 \times 10^5$

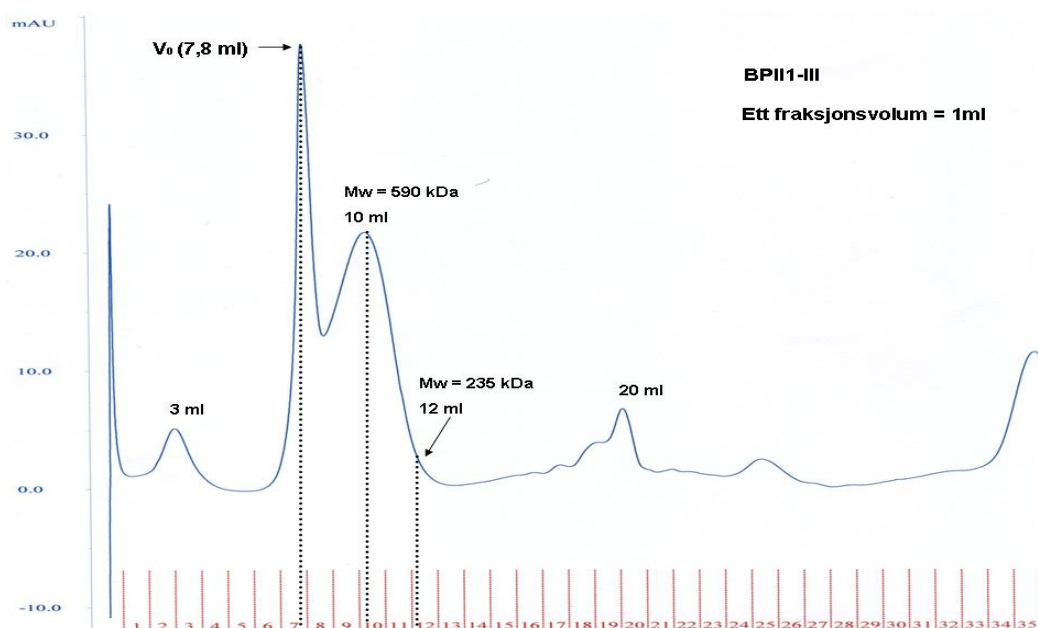


**Figur 6-9:** Kromatogram for BPII1-II kjørt gjennom Superose 6 som er koblet opp mot FPLC-apparatur og absorbansen måles ved 214 nm. Elueringsvæsken er 10 mM NaCl.  $V_0$  er 7,8 ml, og kolonnevolumet er 23,5 ml. Toppmaksimum elueres ut etter 9,2 ml.

Figur 6-9 viser kromatogrammet for BPII1-II etter separasjon på Superose 6 koblet mot FPLC-apparatur. Kromatogrammet er svært likt som for BPII1-I vist i Figur 6-8. Også her sees elueres den første toppen ut med  $V_0$  noe som tyder på at prøvesubstansen har en høyere Mw enn hva kolonnen separerer, og en oppsamling av materiale er trolig årsak til at topp eluert ut etter 7,5 ml er større enn neste topp som elueres ut etter 9,2 ml. Topp som vises ved 9,2 ml er toppmaksimum. På grunn av ingen eller svært dårlig grunnlinjeseparasjon er molekylvekten kun beregnet ut fra toppmaksimum, og molekylstørrelsen er distribuert rundt 849 kDa. Topper etter ca 16,5 ml viste ikke innhold av karbohydrater ved FS-test.

**Tabell 6-6:** Estimert molekylvekt (Mw) i Da ved toppmaksimum for BPII1-II

	Mw (Da)
Høyeste Mw	n.d.
Toppmaksimum, Mw (9,2 ml)	$8,49 \times 10^5$
Laveste Mw (11,5 ml)	$2,96 \times 10^5$



**Figur 6-10:** Kromatogram for BPII1-III kjørt gjennom Superose 6 som er koblet opp mot FPLC-apparatur og absorbans måles ved 214 nm. Elueringsvæsken er 10 mM NaCl.  $V_0$  er 7,8 ml og kolonnevolumet er 23,5 ml. Toppmaksimum elueres ut etter 10 ml.

Figur 6-10 viser et kromatogram for BPII1-III etter separasjon på gelfiltreringskolonnen Superose 6 koblet mot FPLC-apparatur. Kromatogrammet er svært likt som for BPII1-I og BPII1-II, vist i Figur 6-8 og 6-9. Første topp kommer ut med eksklusjonsvolumet,  $V_0$ , som tyder på at ekstraktet har en høyere  $M_w$  enn hva kolonne kan separere. En oppsamling av prøvesubstans er trolig årsaken til at topp ved 7,8 ml er høyere enn topp ved 10 ml. Kromatogrammet for BPII1-III (Figur 6-10) viser et toppmaksimum ved 10 ml og AUC for fraksjonen er større enn toppmaksimum BPII1-I og BPII1-II, sannsynligvis fordi BPII1-III inneholder molekyler av mindre størrelse. Toppen ved 3 ml antas å være forurensning ettersom den elueres ut før  $V_0$ , og hverken denne eller toppen ved 20 ml viste ved FS-test å inneholde karbohydrater. På grunn av ingen eller svært dårlig grunnlinjeseparasjon er molekylvekten kun beregnet ut fra toppmaks. Molekylstørrelsen antas derfor å være jevnt distribuert rundt 590 kDa.

**Tabell 6-7:** Estimert molekylvekt ( $M_w$ ) i Da ved toppmaksimum for BPII1-III

	<b><math>M_w</math> (Da)</b>
<b>Høyeste <math>M_w</math></b>	n.d.
<b>Toppmaksimum, <math>M_w</math> (10 ml)</b>	$5,90 \times 10^5$
<b>Laveste <math>M_w</math> (12 ml)</b>	$2,35 \times 10^5$



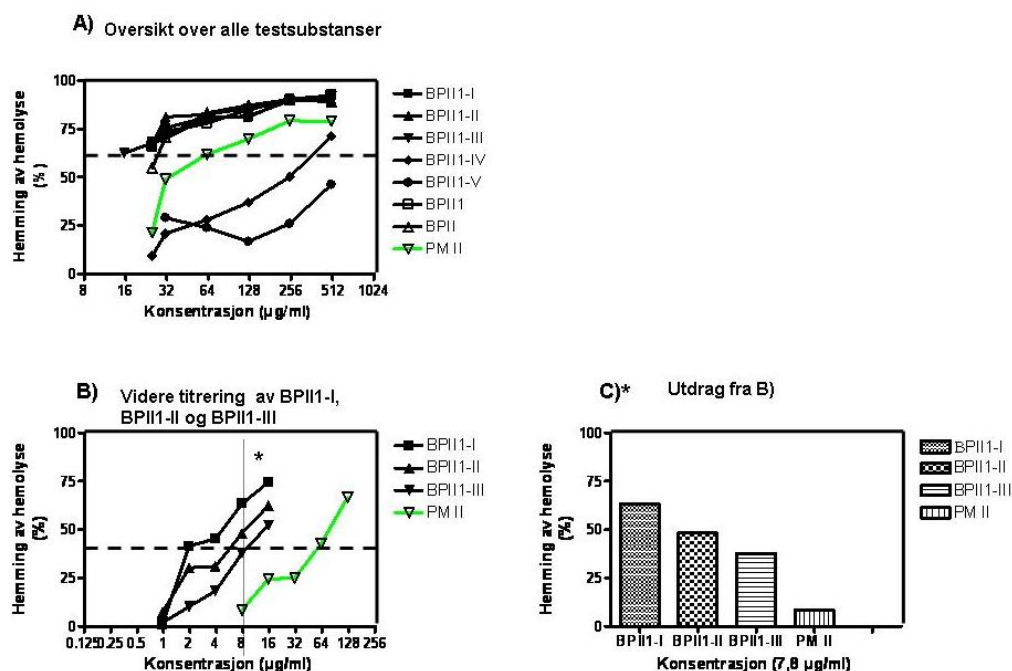
Til sammenligning med resultatene presentert ovenfor viste BP100 III (tilsvarer BPII) en Mw på 31kDa (Inngjerdingen *et al.*, 2006). Molekylvekten ble da bestemt vha SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatographic analysis with Multi-Angle Laser Light Scattering Detection) som regnes for å være en langt sikrere metode ettersom man da måler Mw direkte på molekylet mot kjente standarder i stedet for å måle indirekte som med gelfiltreringskolonnen Superose 6.

Årsaken til den store molekylvektsforskjellen kan komme av aggregatdannelse pga molekylets forgrenede struktur. Kolonnens egenskaper i seg selv kan også påvirke ekstraktet og separasjonsegenskapene. Superose 6 er en kolonne som separerer de største molekylstørrelsene og skulle derfor være best egnet. Dersom de store molekylstørrelsene kommer av at karbohydratene har aggregert bør det senere vurderes å tilsette noe som forhindrer aggregatdannelse. Å bruke 10mM NaCl-løsning som elueringsmiddel skulle i utgangspunktet bidra til dette. En mulig løsning kunne vært å bruke en sterkere saltkonsentrasjon.

## 6.4. Immunmodulerende aktivitet

### 6.4.1. Komplementfiksering

En metode for å undersøke fraksjoners biologiske aktivitet er måling av *in vitro* effekt på det humane komplementsystem. Prøvene som testes kan påvirke enkelte komplementfaktorer som igjen fører til redusert evne til å lysere røde blodceller som er dekket av antistoffer. Aktivitet i testen måles i prosent inhibering av hemolyse og en viktig parameter for testen er  $ICH_{50}$ .  $ICH_{50}$  er den konsentrasjonen av en prøve som gir 50% hemming av hemolyse i indikatorsystemet. Bruk av  $ICH_{50}$  har begrensninger, ettersom det testes i et biologisk og dermed dynamisk system og det vil være variasjoner i faktorer i testsystemet fra dag til dag. I tillegg til  $ICH_{50}$  bør derfor også den relative aktiviteten i forhold til PM II tas i betraktning ved vurdering av resultater. Testen er ikke i stand til å skille aktivisering og hemming av komplementsystemet. For alle undersøkte ekstrakter ble testen gjennomført minst to ganger. *Plantago major* L., fraksjon II (PM II) ble benyttet som positiv kontroll. Dette pektinet inneholder både HG, RGI og RGII, og er vist å aktivere både på det klassiske og det alternative komplementsystemet (Michaelsen *et al.* 2000).



**Figur 6-11: Komplementfikserende aktivitet.** Figur A viser hemming av hemolyse hos alle testsubstansene. PM II er positiv kontroll. Figur B viser en videre titrering av de tre mest aktive fraksjonene sammenlignet med PM II. Figur C viser et stolpediagram ved konsentrasjonen 7,8 µg/ml der hemolysehemmingen til de fire testsubstansene vises. Komplementserum #6 brukes i testen.

Figur 6-11 A viser den komplementfikserende aktiviteten til ekstrakt fra ionebytter, BPII, samt ekstrakter fra gelfiltreringskolonne BPII1, BPII1-I, BPII1-II, BPII1-III, BPII1-IV og BPII1-V sammenlignet med PM II. Alle fraksjoner med unntak av BPII1-IV og BPII1-V viste en mer potent aktivitet enn PM II, og bekrefter med dette de resultater som tidligere er blitt vist av Inngjerdingen *et al.* (2006). BPII1-IV og BPII1-V ble ikke jobbet videre med på bakgrunn av den begrensede aktiviteten i testsystemet. Figur 6-11B viser den ytterligere titreringen av de tre mest aktive fraksjonene sammenlignet med PM II. Figur 6-11C beskriver hemolysehemmingen gitt i % ved konsentrasjonen 7,8 µg/ml. Tabell 6-8 presenterer en oversikt over  $ICH_{50}$ -verdiene til ekstrakter vist i Figur 6-11. BPII1-I har lavest  $ICH_{50}$ -verdi, som derved viser høyest aktivitet, etterfulgt av BPII1-II og BPII1-III (Tabell 6-8). I kap 6.3.2 ble det foreslått at disse fraksjonene kunne inneholde hårete rhamnogalakturnonanområder. Dette er strukturer som tidligere har vist sammenheng med aktivisering av to av aktiveringsveiene for komplementsystemet (Yamada og Kiyohara 1999).

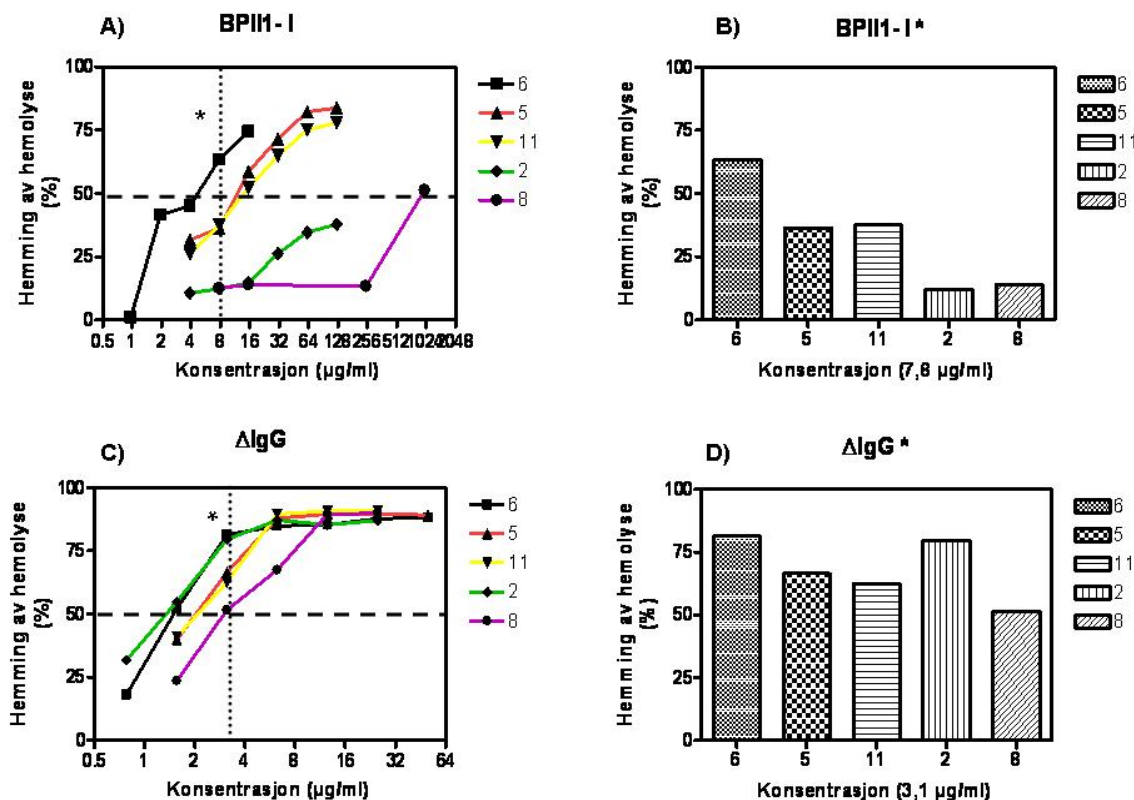
**Tabell 6-8:** Oversikt over  $ICH_{50}$ -verdiene til prøvene og som kan leses ut av Figur 6-11

Ekstrakt	$ICH_{50}$ (µg/ml)
BPII1-I	4,7
BPII1-II	8,5
BPII1-III	14
BPII1-IV	247,5
BPII1-V	> 500
BPII1	< 15,6
BPII	< 15,6
PM II	77

#### 6.4.2. Komplementfikseringstest ved bruk av humant serum fra et utvalg friske frivillige

Tidligere studier på PM II har vist stor forskjell i aktivitet avhengig av hvilken person det humane serumet som anvendes i komplementfikseringstesten kommer fra.

Komplementtesten beskrevet i kapittel 6.4.1 (for metode, se kap 5.5.2) er den rutinemessige metoden vi bruker for å måle testsubstansers antikomplementære aktivitet i et indikatorsystem. Metoden kalles også Metode A. Metode B er en annen metode beskrevet av Michaelsen *et al.* (2000) som på en mer fysiologisk måte brukes til å teste den antikomplementære aktiviteten på. Her brukes ufortynnet humant serum i et sjakktitreringsoppsett i stedet for den serumkonsentrasjonen som gir 50% lyse av 1% SRBC. Fortynning av testsubstans og inkubering skjer på tilsvarende måte som i metode A. Ved å bruke metode A viste Michaelsen *et al.* (2000) en tohundredfolds variasjon i den komplementfikserende aktiviteten til PM II dersom det ble bruk humant serum fra forskjellige personer. Med metode B så man derimot langt mindre variasjon og PM IIs antikomplementære aktivitet varierte bare med en tifold. Den positive kontrollen  $\Delta IgG$  (aggregert IgG) viste en stabil komplementfikserende aktivitet i begge metoder (Michaelsen *et al.*, 2000). Metode A foretrekkes ettersom den gir et mer følsomt testsystem, og det forbrukes mindre reagenser i forhold til metode B.



**Figur 6-12:** Figur A og C viser en sammenligning av den komplementfikserende aktiviteten til BPII-I og  $\Delta$ IgG ved bruk av forskjellige sera. Figur B og D viser hemming av hemolyse ved gitte konsentrasjoner og illustrerer aktivitetsforskjellen

BPII-I-s komplementfikserende aktivitet ved bruk av forskjellige sera ble testet sammen med kontrollene  $\Delta$ IgG og PM II.  $\Delta$ IgG er en positiv kontroll for aktivisering av den klassiske aktiveringsvei. De serum det ble testet på her er de samme som ble vist i artikkel av Michaelsen *et al.* (2000), i tillegg til serum nr 11. Resultatene illustrert i Figur 6-12 samsvarer i stor grad med funnene for PM II i artikkelen. Tabell 6-9 viser en oversikt over  $IC_{50}$ -verdiene, og for BPII-I varierer den opptil tohundrefold. BPII-I viste høyest aktivitet ved bruk av Serum #6 som ga en  $IC_{50}$ -verdi på 4,7  $\mu$ g/ml. Ved bruk av Serum #8 derimot var  $IC_{50}$ -verdien 950  $\mu$ g/ml. De samme sera viste derimot liten forskjell for  $\Delta$ IgG, med en  $IC_{50}$ -verdi på hhv 1,5  $\mu$ g/ml og 3,0  $\mu$ g/ml. Interaksjonen mellom komplementsystemet og BPII-I ser derfor ut til å være annerledes enn den interaksjon som forekommer for  $\Delta$ IgG. En mulig årsak til variasjon i sensitivitet avhengig av valg av serumkilde kan være forskjellig mengde med Ab mot BPII-I i sera. En årsakssammenheng som dette for PM II konkluderte Michaelsen *et al.* (2000) å være lite sannsynlig da det ikke var korrelasjon mellom nivå av IgG eller IgM mot PM II og aktivitet i systemet. Det er behov for flere studier for å bedre kunnskapen om reaksjonsmekanismene.

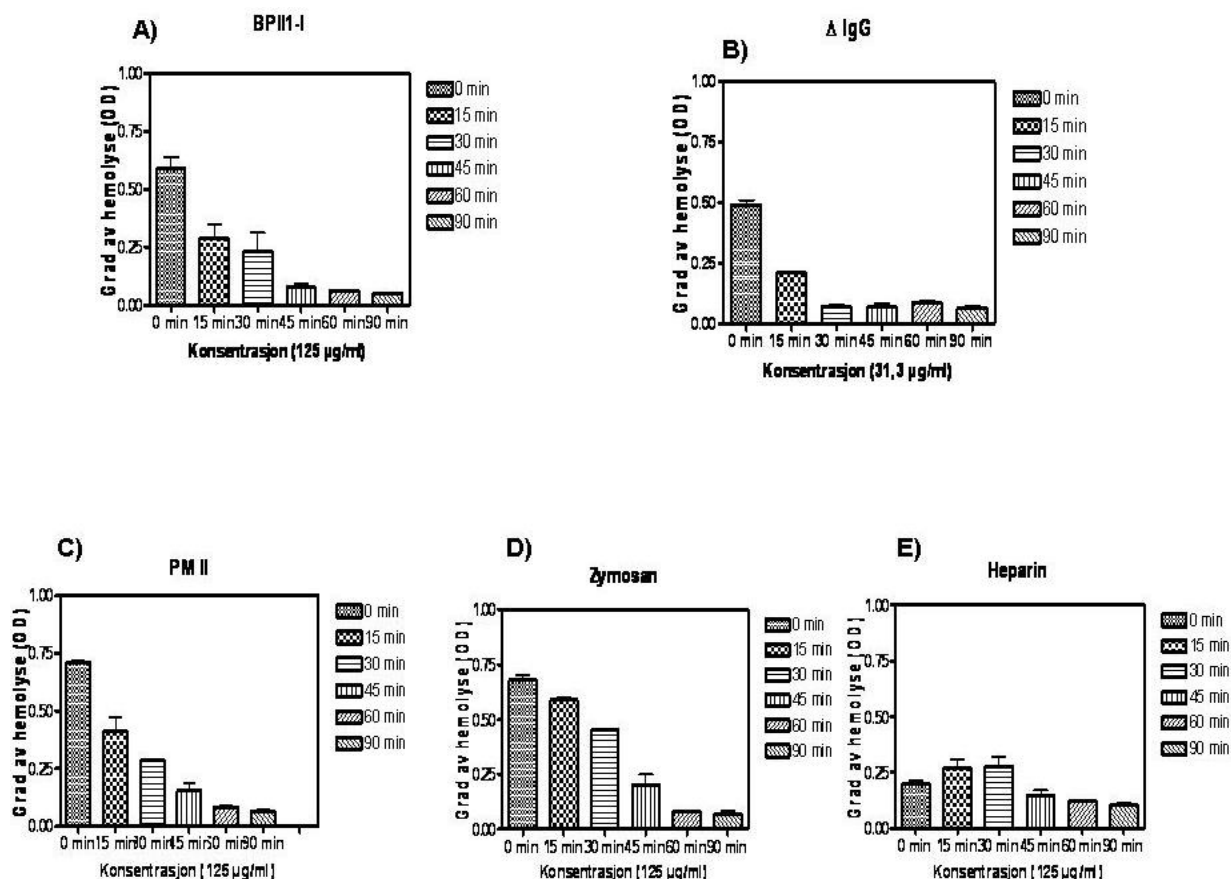
**Tabell 6-9:** Variasjon av  $ICH_{50}$  – verdiene viser komplementserum fra forskjellige personer. Resultatene er tatt fra Figur 6-12.

Serumkilde	$ICH_{50}(\mu\text{g/ml})$ BPII1-I	$ICH_{50}(\mu\text{g/ml})$ $\Delta$ IgG	$ICH_{50}(\mu\text{g/ml})$ PM II	Ratio BPII1-I/ $\Delta$ IgG	Ratio PM II/ $\Delta$ IgG
6	4,7	1,5	77	3,1	51,3
11	10,7	2,7	99,3	4,0	36,8
5	12	3,0	70,4	4	23,5
2	> 125	1,3	198	>96,1	152,3
8	952,7	3,0	>1000	317,6	>333,3

Tabell 6-9 viser en oversikt over  $ICH_{50}$ -verdiene til resultatene presentert i Figur 6-12. I tillegg er ratio for BPII1-I/ $\Delta$ IgG og PMII/ $\Delta$ IgG beregnet. Enkelte  $ICH_{50}$ -verdier kunne ikke beregnes siden hemmingen ikke nådde over 50% for de konsentrasjonene brukt i testen. Verdiene for BPII1-I korrelerer godt med de resultater PM II som ble presentert av Michaelsen *et al.* (2000). Verdiene for PM II presentert i denne oppgaven viser riktignok en lavere ratio-variasjon (PMII/ $\Delta$ IgG ) enn for BPII1-I (BPII1-I/ $\Delta$ IgG ). Dette kan komme av tilfeldigheter pga variasjoner under komplementtestens forhold. En annen mulighet til resultatene er at BPII1-I utøver sin komplementfikserende aktivitet gjennom andre reaksjonsmekanismer enn PM II.

#### 6.4.3. Preinkubering og ikke preinkubering av testprøvene og komplementkilden

Komplementfikseringstesten beskrevet tidligere viser om testprøven har aktivitet eller ikke. Den sier derimot ingenting om effekten kommer av en komplementaktivering, der komplement forbrukes av testprøven, eller om det skjer en direkte inhibering. Forsøk på å skille mellom aktivering og inhibisjon er basert på en artikkel av Alban *et al.* (2002) går ut på å variere inkuberingstiden til komplement og testprøve fra 0-90 minutter. Heparin er en kjent komplementinhibitor og ble benyttet som kontroll i testen.  $\Delta$ IgG er en kjent komplementaktivator av den klassiske komplementvei. Zymosan er en kjent aktivator av den alternative komplementvei. Ved å sammenligne kontrollenes og testprøvenes respons i testsystemet, kan vi få mer informasjon om mulige reaksjonsmekanismer.



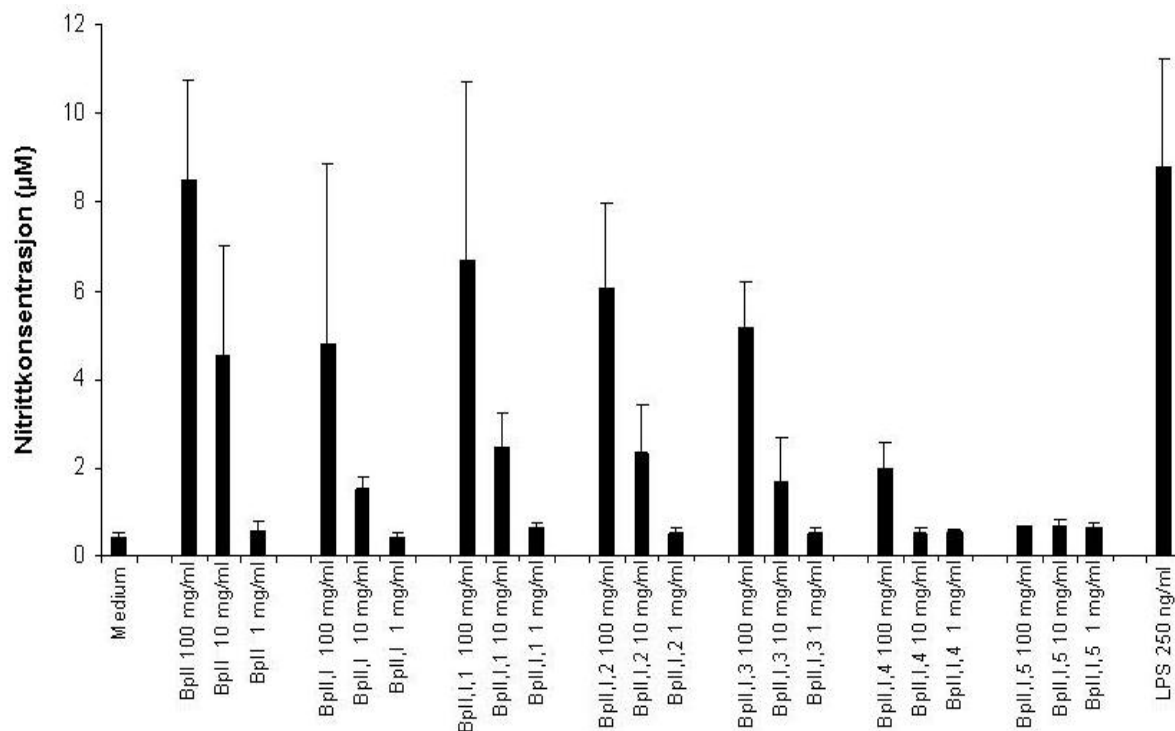
**Figur 6-13:** BPII-I,  $\Delta$ IgG, PM II, Zymosan og Heparin vises i Figur A-E. Grad av hemolysehemming ved bruk av serum #6 er målt ved 0, 15, 30, 45, 60 og 90 minutter og benevnes med OD (OD = optical density). Prøveresultatene er målt ved en absorbanse på 405 nm.

Figur 6-13 presenterer de fem forskjellige testprøvenes aktivitet ved inkuberingstid fra 0-90 minutter. Figurene A, B, C og D viser en lik respons der graden av hemolyse er avhengig av inkuberingstid for å kunne utøve sin effekt, og de viser en komplementaktiverende aktivitet. Figur 6-13E ga en god hemming allerede ved 0 min, noe som stemmer overens med heparinets egenskaper. Ut ifra disse resultatene kan det tyde på at BPII-I utøver sine komplementmodulerende egenskaper gjennom en aktivisering av testsystemet. Testen sier derimot ingenting om prøven aktiverer gjennom den klassiske eller alternative komplementvei.

#### 6.4.4. Makrofagstimulering

Når makrofager aktiveres utskilles en rekke mediatorer. En av disse er nitrogenoksid, NO, som blant annet fører til økt makrofagaktivering. Forbindelsen er svært flyktig, og brytes raskt ned til avfallsproduktet nitritt. Nitritt er en betydelig mer stabil forbindelse, og kan derfor påvises ved hjelp av Griess-reagenssystemet.

Figur 6-14 viser resultatene for nitritmåling av de samme fraksjonene som det ble utført komplementfikseringstest på. I tillegg til prøvesubstansene er måling også utført på den positive kontrollstandard lipopoysakkarid, LPS.



**Figur 6-14:** Nitritmåling for BPII, BPII-I, BPII-II, BPII-III

Resultatene i Figur 6-14 tyder på en doseavhengig sammenheng mellom prøvekonsentrasjon og NO-utskillelse fra makrofagene. BPII synes riktignok å stimulere makrofager i noe større grad enn resten av fraksjonene. Ettersom dette er den fraksjonen med flest forurensninger kan dette være en mulig årsak til aktivitet. BPII-I har marginalt høyere aktivitet enn BPII-II og BPII-III, og BPII-IV og BPII-V viser meget lav aktivitet. Resultatene korrelerer med prøvesubstansenes effekt på komplementsystemet (Figur 6-11).

### 6.5. *Strukturoppklaring ved enzymatisk degradering og effekt på biologisk aktivitet*

Innhold av Ara, Gal og Rha i tillegg til GalA i samtlige BP-fraksjoner tidligere beskrevet, viser at polysakkaridene er pektiner (Tabell 6-3). For å opparbeide mer strukturinformasjon kan pektiner enzymatisk behandles med f.eks  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase og  $\beta$ -galaktosidase, benyttet i dette tilfellet.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase spalter bindinger der Ara $\beta$  inngår og  $\beta$ -galaktosidase spalter bindinger der Gal inngår. På bakgrunn av at BPII1-II og BPII1-III viste høy aktivitet i komplementfikseringstesten (Figur 6-11), ble det bestemt å gjennomføre enzymatisk degradering av disse fraksjonene for kartlegging av struktur/aktivitetsforhold. Analyse av bindingsforhold var ikke gjennomført ved enzymdegraderingens start. Valg av enzym ble basert på tidligere arbeide med *B. petersianum*, der det ble valgt aktuelle enzymer som ikke før var blitt utprøvd. BPII1-II ble behandlet med  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, mens BPII1-III ble enzymdegradert med både  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase og  $\beta$ -galaktosidase.

#### 6.5.1. Enzymatisk degradering

BPII1-II (14,6 mg) og BPII1-III (19,6 mg) ble degradert med enzym som beskrevet i metode 5.4.2. Etter degradering ble prøvene applisert på PD10-kolonne (metode 5.2.4.2) og de store pektinområdene ble separert fra de mindre avspaltede Ara $\beta$ - og Gal-forbindelsene. Elueringsprofil ble bestemt ved hjelp av FS-testen. Det ble samlet én høymolekylær (BPII1-IIe og BPII1-IIIE) og en lavmolekylær (BPII1-IIe2 og BPII1-IIIE2) fraksjon for hver prøve. Prøvene ble frysetørket og tatt videre til metanolyse, metylering og komplementfiksering.

#### 6.5.2. Karbohydratsammensetning

Karbohydratsammensetning for de enzymatisk degraderte fraksjonene ble bestemt etter metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Tabell 6-10 viser en oversikt over karbohydratsammensetningen for fraksjonene før og etter enzymatisk degradering.



**Tabell 6-10:** Karbohydratsammensetning etter enzymatisk degradering. BPII1-IIIE og BPII1-IIIE sammenlignet med BPII1-II og BPII1-III. Verdiene er oppgitt som prosent av totalt karbohydratinhold. <sup>a</sup>n.d. = not detected

	BPII1-II	BPII1-IIIE	BPII1-IIIE2	BPII1-III	BPII1-IIIE	BPII1-IIIE2
<b>Ara</b>	6,2	4,1	100	5,9	4,7	4,3
<b>Rha</b>	9,9	8,0	n.d.	10,4	9,2	8,9
<b>Fuc</b>	spor	spor	<sup>a</sup> n.d.	spor	n.d.	n.d.
<b>Xyl</b>	7,6	7,6	n.d.	7,4	8,0	7,9
<b>Man</b>	0,5	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
<b>Gal</b>	10,4	6,8	n.d.	9,4	n.d.	6,9
<b>Glc</b>	5,9	12,3	n.d.	5,6	12,3	12,4
<b>GlcA</b>	3,3	n.d.	n.d.	3,7	n.d.	n.d.
<b>4-O-Me-GlcA</b>	spor	spor	n.d.	spor	n.d.	n.d.
<b>GalA</b>	56,2	61,2	n.d.	57,1	65,8	59,6
<b>% Karbohydrater i prøvematerialet</b>	100,2%	111,9%	57,7%	49,5%	72,5%	69,8%

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase skal i utgangspunktet bare spalte Ara på furanoseform, men arabinofuranosidase er ikke 100% spesifikt. Den enzymatiske degraderingen kan se ut til å ha redusert mengde Ara både i BPII1-II og BPII1-III, men forskjellen er ikke større enn at det også kan skyldes variasjoner i systemet. En ufullstendig degradering av Ara kan komme av flere momenter, og polysakkaridene har trolig store komplekse områder med forgreninger (Bindingsforhold, 6.3.2), noe som kan gjøre det vanskelig for enzymene å komme til.

BPII1-IIIE2 inneholder i tillegg til Ara og Gal som forventet, Rha, Xyl, GalA og Glc. En mulig årsak til dette er dårlig separasjon på PD10-kolonnen og til tross for at en karbohydratprofil ble gjort vha FS-testen gjør PD10 kun en grovseparasjon. En annen mulighet er at Gal-bindinger har blitt spaltet av og at andre sukkertyper kan ha vært bundet til Gal, og dermed blitt spaltet av samtidig.

BPII1-IIIE har mistet det meste av sin Gal, og dette tyder på at enzymet har virket som det skal. Det kan derfor virke som Gal i prøven har vært lett tilgjengelig for enzymet.

BPII1-IIIE, BPII1-IIIE og BPII1-IIIE2 inneholder store mengder Glc. Dette skyldes trolig PD10-kolonnen som fraksjonene ble separert og desaltet med. Kolonnen inneholder Glc-materiale og en forurensning fra denne er ikke uvanlig.

Det ble isolert svært små mengder av BPII1-IIIE2 og BPII-IIIIE2, og disse prøvene kunne derfor ikke taes videre til GC-MS.

### 6.5.3. Bindingsforhold

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i de enzymatisk degraderte polysakkaridfraksjonene ble bestemt ved karboksylsyre-reduksjon og påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse (metode 5.4.1). Prosentvis innhold av de forskjellige monosakkaridene med ulike bindingstyper for de enzymdegraderte fraksjonene sammenlignet med BPII1-II og BPII1-III er vist i Tabell 6-11.

Prøven av BPII1-IIIIE ga en så lav konsentrasjon at resultatene fra GC-MS blir for usikre til å beregne mengde av bindingforholdene. Resultatene gir likevel svar på hvilke bindinger som forekommer og er angitt med en X i Tabell 6-11.

For BPII1-IIIE sees en reduksjon i mengde Ara<sub>f</sub>T, som kan forventes i forhold til enzymets egenskaper ( $\alpha$ -arabinofuranosidase). Andel av 1,4-GalA har økt som indikerer at BPII1-IIIE består av store HG-områder. Andel Xyl som trolig sitter på GalA korrelerer med 1,4-GalA og forgreningspunkter på GalA.

I BPII1-IIIIE var all Ara<sub>f</sub>T degradert. I noen grad fantes det forgreningspunkter igjen. Det er heller ikke spor etter Gal, og totalt sett tyder dette på at den enzymatiske degraderingen var vellykket. Dette bekrefter resultatene etter monosakkaridbestemmelsen, Tabell 6-10. Strukturen består nå trolig av GalA-kjede med noen få Rha heftet til seg. På Rha kan det sitte Ara. Xyl<sub>p</sub>T finnes fortsatt i prøven, og sitter direkte på GalA-kjeden.

**Tabell 6-11:** Bindingsforhold etter enzymdegradering for BPII-IIE og BPII-III sammenlignet med BPII-II og BPII-III.

		BPII-II	BPII-IIE	BPII-III	BPII-IIIIE
<b>Ara</b>	<b>Terminal</b>	4,97	2,61	4,84	
	<b>1,3</b>				
	<b>1,4/5 *</b>	0,90	0,84	0,82	X
	<b>1,3,5 **</b>	0,24	0,54	0,24	
<b>Fuc</b>	<b>Terminal</b>	Spor		Spor	
<b>Glc</b>	<b>Terminal</b>	0,84	1,20	1,22	
	<b>1,4</b>	5,06	11,10	4,38	
	<b>1,4,6</b>				
<b>Rha</b>	<b>Terminal</b>	0,11		0,63	
	<b>1,2</b>	5,41		6,80	X
	<b>1,2,4</b>	4,07		2,96	
<b>Gal</b>	<b>Terminal</b>	5,33	4,16	6,09	
	<b>1,3</b>	1,52	1,25	1,30	
	<b>1,6</b>	2,20	0,56	1,02	
	<b>1,3,6</b>	1,30	0,82	0,99	
	<b>1,3,4,6</b>				
<b>Xyl</b>	<b>Terminal</b>	7,40	7,6	7,18	X
	<b>1,4</b>	0,20		0,22	
<b>GlcA</b>	<b>Terminal</b>	0,47		0,80	
	<b>4-O-Me-</b>	2,83		2,90	
<b>GalA</b>	<b>Terminal</b>			7,46	X
	<b>1,4</b>	49,38	55,64	43,46	X
	<b>1,3,4</b>	6,38	5,57	5,63	X
	<b>1,2,4</b>	0,44	0,55		

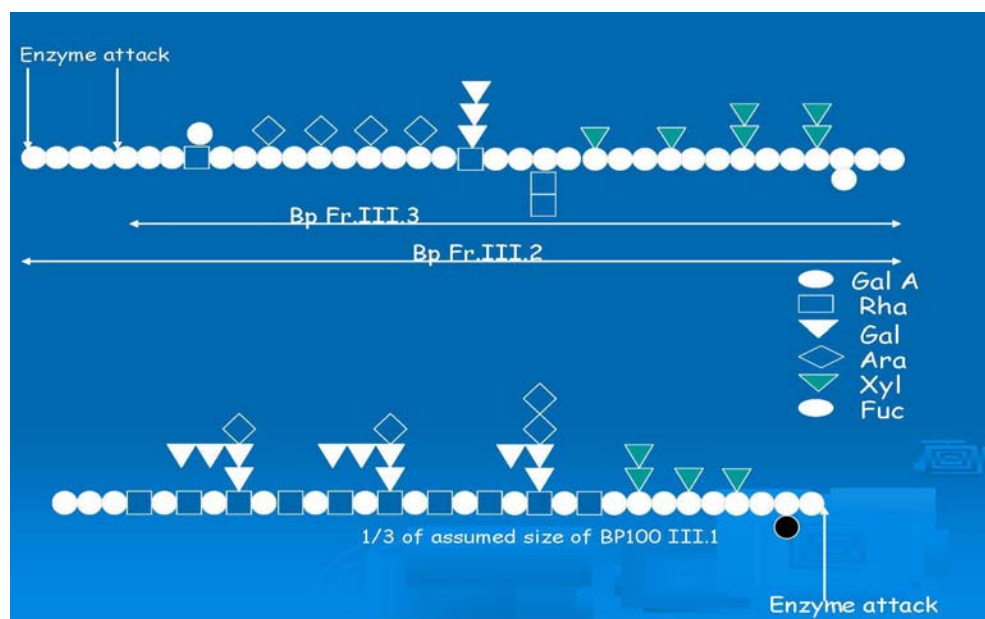
\*Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at dette er 1,5-bundet Ara og ikke 1,4-bundet.

\*\* Basert på erfaring fra tidligere analyser av lignende forbindelser ved avdelingen er det rimelig å anta at 1,3,5-bundet Ara har kortere retensjonstid enn 1,2,5-Ara.

Den kraftige økningen i andelen 1,4-Glc i begge fraksjoner er det rimelig å anta skyldes forurensning (se kapittel 6.5.2).

Bestemmelse av bindingsforhold har tidligere blitt gjort på *B. petersianum* av Inngjerdingen. Figur 6-15 viser den foreslåtte struktur av BP-fraksjoner etter at testprøvene har blitt enzymatisk degradert med pectinase. Her ble det også funnet lange GalA-kjeder (1,4-bundet) med XylpT og 1,4-Xyl bundet direkte til hovedkjeden. Små Gal- og AGII- sidekjeder er bundet til GalA. Rha som forgreningspunkter vises også. Resultatene til Inngjerdingen viste en særlig høy komplementfiksierende aktivitet hos

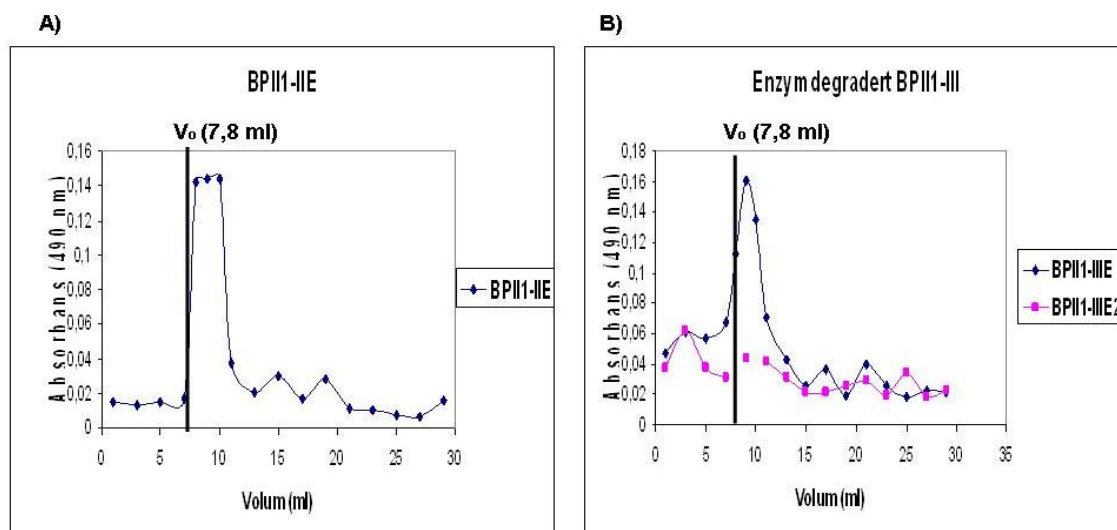
BP100 III.1. Figur 6-15 foreslår strukturer som RGI, AGII og XG i denne fraksjonen. Dette viser likheter med de funn som er blitt gjort i denne oppgaven.



**Figur 6-15:** Foreslått struktur av fraksjoner av *B. petersianum*. De tre fraksjonene er resultatet etter enzymdegradering med pectinase, der BP100 III.1 viste særlig høy aktivitet ( $ICH_{50} < 2\mu\text{g/ml}$ ).

#### 6.5.4. Molekylvektsdistribusjon

Undersøkelse av molekylvekt ble utført med gelfiltrering på Superose 6 på tilsvarende måte som i kapittel 6.3.3. Karbohydratelueringprofilen viste tilsvarende molekylstørrelse for BPII1-IIIE og BPII1-IIIE som for hhv BPII1-II og BPII1-III, og prøvesubstansene ble også nå eluert ut med  $V_0$  (Figur 6-16). BPII1-IIIE2 ble ikke undersøkt pga mangel på prøvemateriale.

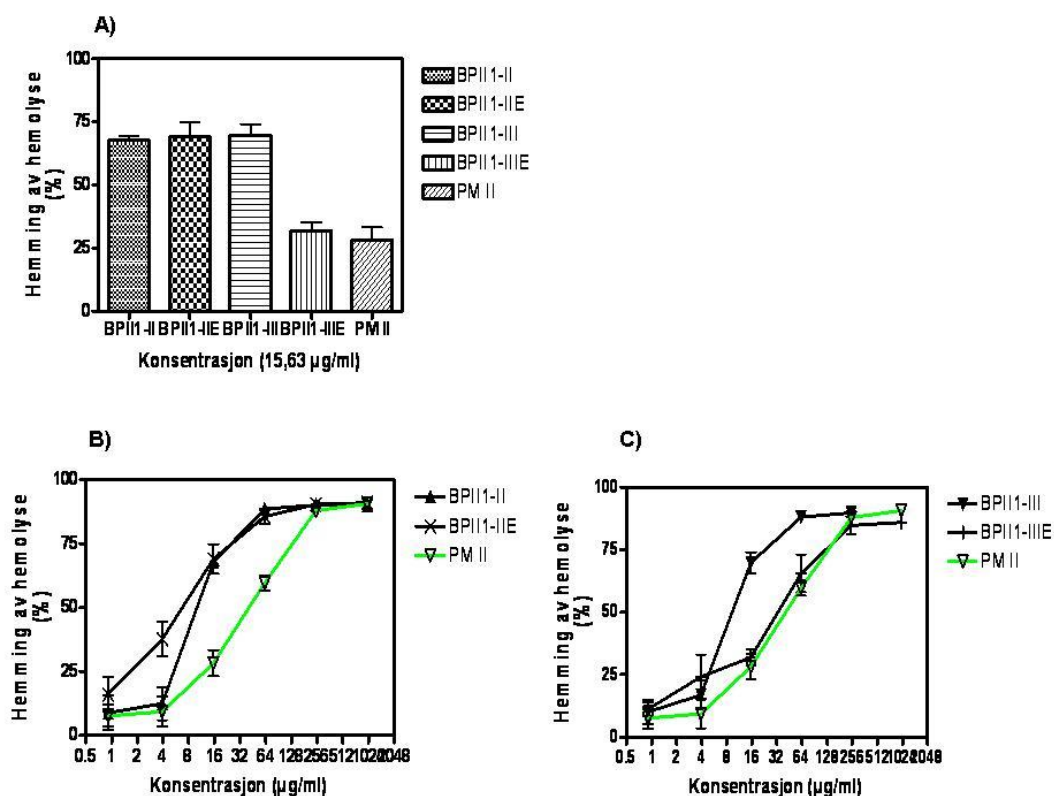


**Figur 6-16:** Figur A viser karbohydratelueringprofilen til BPII1-III. Figur B viser karbohydratelueringprofilen til BPII1-III E2. Fraksjonene kommer ut i  $V_0$ . Eluering på Superose 6 (kolonnevolum 23,5 ml) med 10 mM NaCl.

Ettersom begge fraksjoner elueres ut med  $V_0$  er det ikke mulig å beregne Mw basert på regresjonslinjen til standardkurve i Figur 6-7. Mulige årsaker til høy Mw beskrives i 6.3.3 og det er rimelig å anta at det samme gjelder her.

### 6.5.5. Biologisk aktivitet på enzymatisk degradert materiale

Det ble utført komplementfikseringstest på det enzymatisk degraderte materialet og moderfraksjonene for å undersøke om enzymspaltingen hadde medført endring i komplementfikserende aktivitet. Resultatene er presentert i Figur 6-17.



**Figur 6-17:** Komplementfikserende aktivitet av de enzymdegraderte ekstraktene BPII1-IIIE og BPII1-IIIIE sammenlignet med hhv BPII1-II og BPII1-III. Komplementserum #6 er benyttet i testen.

Figur 6-17 A viser testprøvenes grad av hemolysehemming ved 15,6 µg/ml. Dersom riktig molekylvekt hadde blitt bestemt (Molekylvektsdistribusjon, 6.5.4) ville det vært mer presist å angi X-aksen med mol/liter, ettersom molekylvekt og dermed konsentrasjon (mol/liter) antas å være forskjellig før og etter enzymatisk degradering. PM II blir brukt som positiv standard. Figur 6-17 A viser at samtlige fraksjoner har en høyere aktivitet enn PM II, om enn marginalt for BPII1-IIIIE. Figur 6-17 A og B beskriver kun en liten endring i aktivitetsegenskapene som følge av at BPII1-II har blitt enzymdegradert med  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Figur 6-17 A og C viser en større forskjell i aktiviteten for BPII1-IIIIE, som reduseres når Gal også spaltes av. Trolig består BPII1-IIIIE av lange HG-kjeder med GalA der Xyl stedvis er bundet enkeltvis til kjeden, RGI- og AGII- strukturer har trolig blitt spaltet vekk under enzymdegradering. Tabell 6-12 viser  $ICH_{50}$ -verdien for de forskjellige testsubstansene. BPII1-IIIIE viser tilsvarende grad av aktivitet som PM II.

**Tabell 6-12:** Oversikt over  $ICH_{50}$ -verdiene til ekstraktene presentert i Figur 6-17

Ekstrakt	$ICH_{50}$ (µg/ml)
BPII1-II	7,0
BPII1-IIIE	6,7
BPII1-III	9,3
BPII1-IIIIE	40,6
PM II	40,9

## 7. Etnofarmakologiske studier i Mali

### 7.1. *Etnofarmakologi*

Læren om ulike kulturers bruk av planter til forskjellige formål kalles etnobotanikk. Etnofarmakologi er en underdisiplin til etnobotanikk som tar for seg kulturers tradisjonelle bruk av planter til medisinske formål (Farnsworth, 1994).

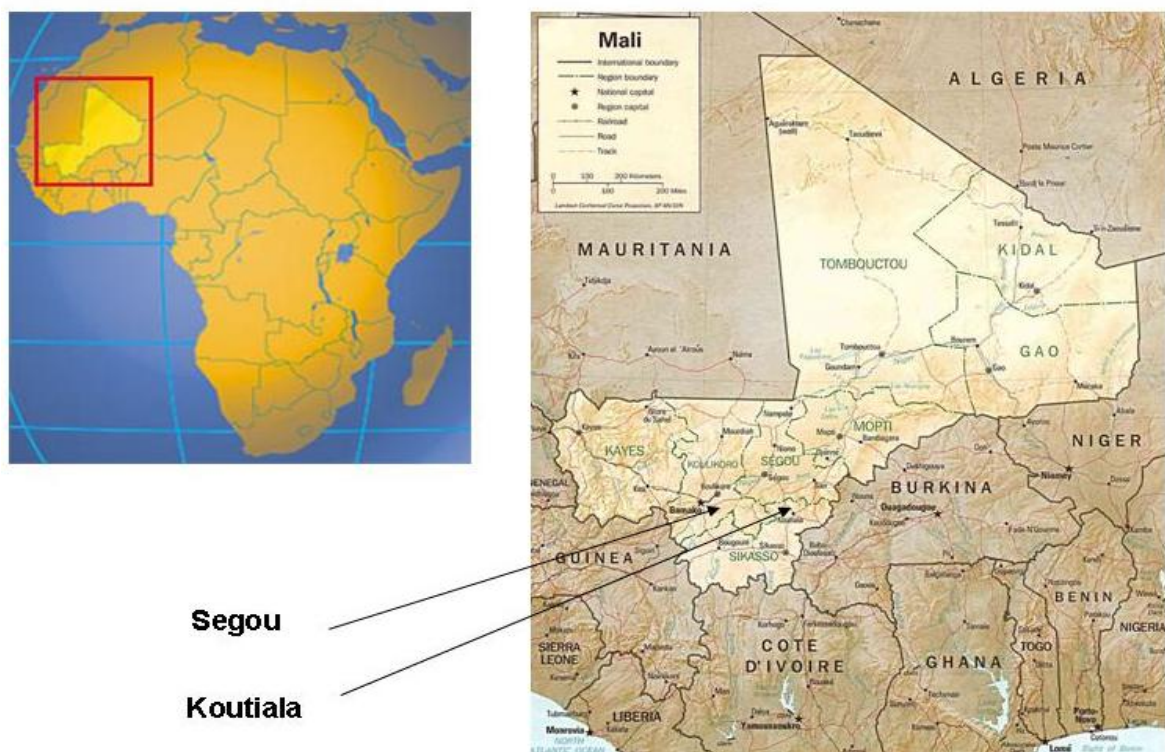
Det testes mange tusen substanser for hver aktive substans som finner veien som legemiddel til markedet. Å utvikle nye legemidler er derfor en kostbar og risikabel prosess. Ved å samle informasjon vedrørende tradisjonell bruk, tenker man at sjansene øker for å finne farmakologisk aktive substanser (Farnsworth, 1994). Mange viktige legemidler som er i bruk i dag ble opprinnelig oppdaget på bakgrunn av tradisjonell medisinsk bruk av planter. Blant disse kan nevnes opiater, kinin, vinkristin og digitalis-glykosider (Cox og Balick, 1994).

Tverrfaglig samarbeid er en av nøklene i etnofarmakologisk forskning, der prosesser som identifikasjon, innhøsting, karakterisering av innholdsstoffer og aktivitetstesting er prosesser som krever spesialkompetanse fra forskjellige fagfelter. Ofte involveres ressurser med bakgrunn fra medisin, farmakognosi, sosialantropologi, botanikk, biologi, farmakologi og en rekke andre disipliner i etnofarmakologisk arbeid (Heinrich og Gibbons, 2001).

### 7.2. *Mali*

Mali er et stort land i Vest-Afrika (Figur 7-1), sørvest for Algerie. I utstrekning er Mali Afrikas femte største land, men det har en befolkning på rundt 12 millioner. 48,2% av innbyggerne er under 15 år. Etter Malis løsrivelse fra Frankrike i 1960 har landet vært under diktatorisk styre frem til 1991. Alpha Konare ble Malis første demokratisk valgte president. Etterfølgeren, Amadou Touré, som ble valgt i 2002, er regjerende president (CIA, 2007).

I følge FNs Human Development Index fra 2006, hvor vurdering levestandard, utdannelse og gjennomsnittsalder ligger til grunn, er Mali rangert som 175 av totalt 177 land (CIA, 2007 og United-Nations-Development-Program, 2006). Mali er dermed et av verdens fattigste land. 65 % av arealet er ørken eller halvørken og inntektsdistribusjonen er svært skjev. Mali er sterkt avhengig av utenlandsk bistand og er svært sårbare ovenfor fluktasjoner i verdensmarkedets gull- og bomullspriser. Til tross for en gjennomsnittlig økonomisk vekst på rundt 5 % fra 1996-2006, har uroligheter i omkringliggende land, da spesielt i Elfenbenskysten, vanskeliggjort videre utvikling (CIA 2007, United-Nations-Development-Program 2006).



**Figur 7-1:** Mali ligger i Vest-Afrika (Nations online, 2007 og Nationmaster, 2007)

### 7.3. Tradisjonell medisin i Mali

Det vestafrikanske landet Mali har et helsesystem der konvensjonell medisin står side om side med tradisjonell medisin. Mali har en legedekning på fire leger per 100 000 innbyggere. Til sammenligning har Norge 356 per 100 000. Dette gjør tradisjonell medisin svært viktig for en stor del av den maliske befolkningen. Som i mange andre U-land lever 70% av befolkningen på landsbygda og mange er avhengige av tradisjonell medisin og bruk av medisinplanter for behandling. I tillegg har bruk av tradisjonell



medisin økt i forekomst samtidig med at det har blitt dyrere å kjøpe legemidler (Diallo *et al.*, 2002 og United-Nations-Development-Program, 2006).

Infeksjonssykdommer, parasitter og feilernæring er viktige helseproblemer i Mali. Høy spedbarnsdødelighet (106 per 1 000 levende fødte) og lav forventet levealder (49,5 år) kan i stor grad tilskrives de ovennevnte problemene (CIA, 2007). Malis regjering har forstått viktigheten av et lokalbasert helsesystem, samtidig som de bevisst har tatt vare på lokalkunnskaper og tradisjon. Dermed har de oppnådd økt tilgjengelighet, både geografisk og økonomisk, til helsetjenester for den generelle befolkningen (Diallo og Paulsen, 2000). De fleste planter som brukes har aldri blitt undersøkt med henblikk på deres kjemiske sammensetning eller farmakologiske aktivitet.

I Mali brukes medisplanter for å behandle et utall forskjellige lidelser. Det kan bla nevnes sykdommer som malaria, diare, hepatitt, lungeproblemer, sår og magesår. Sår er vanligvis et ufarlig problem, men uten behandling kan dette medføre verre lidelser som infeksjoner og i verste fall koldbrann (Diallo *et al.*, 2002).

### 7.3.1. "Improved traditional medicines"

Institutt for fytoterapi ble opprettet i Mali i 1968. Det som i dag heter Département de la Médecines Traditionnelles (DMT) har, siden 1973, arbeidet med å bedre den generelle folkehelsen ved å fokusere på lokale healere og bruk av medisplanter. Blant annet forskes det på toksisitet av planter i bruk i tillegg til at det utvikles såkalte "improved traditional medicines" (ITM) som er forbedrede formuleringer av tradisjonelle medisiner. Disse selges gjennom lokale apotek. DMT ligger under Malis folkehelseinstitutt og har siden 1990-tallet samarbeidet med både verdens helseorganisasjon (WHO) og Universitetet i Oslo (Diallo og Paulsen, 2000 og NUFU, 2007).

En etnobotanisk undersøkelse initieres ofte på to måter:

- Valg av en plante, etterfulgt av innsamling av informasjon.
- Valg av en sykdomsindikasjon, og kartlegging av healernes behandlingsmetoder.

Feltarbeidet vil samle verdifull informasjon om hvilke planter healerne bruker på gitte indikasjoner, eller hvilke planter som brukes mot en spesifikk sykdom. Planter som

brukes i forskjellige geografiske områder av landet mot de samme sykdommene, og sykdommer som i tillegg er et nasjonalt folkehelseproblem, fyller viktige kriterier for videre forskningsarbeide. I tillegg er det viktig at planter det velges å forske videre på er vanlig forekommende i den maliske flora, og det må være mulig å dyrke planten (Diallo og Paulsen, 2000 og Diallo, 2007).

Når feltarbeidet er utført og har gitt interessante resultater, kan det videre arbeidet med litteratursøk begynne. Informasjon om tradisjonell bruk, kjemiske forbindelser, tidligere arbeide på området er viktig kunnskap. Hvor mye informasjon som er å få tak i varierer mye i hvert enkelte tilfelle (Diallo, 2007).

Når litteratursøk er utført vil det neste trinn i prosessen være å teste plantens farmakologiske aktivitet. I tillegg er det ønskelig å studere plantens fytokjemi og toksisitet nærmere. Målet er å lage et standardisert og trygt preparat der også dosering blir angitt. Det lages til slutt et salgbart legemiddel. Prisen på det ferdige preparatet bestemmes ut ifra kostnadene (Diallo, 2007).

I 1984 fikk DMT sitt første ITM ut på markedet. Siden den gang har produksjonen hatt en voldsom økning. Følgende syv ITM selges på apotek, og er anerkjent som essensielle legemidler i Mali:

- Gastrosedal (ulcer og gastritt)
- Hepatisan (forstoppelse og ikterus)
- Balembo (tørhoste, beroligende)
- Malarial (malaria)
- Laxa-cassia (forstoppelse)
- Dysenteral (dysenteri)
- Samanoré (hepatitt)



**Figur 7-2:** Bilde av den ferdige pakningen med Gastrosedal, slik den selges på apoteket (Foto: Austarheim, 2007)

### The African Intellectual Property Organisation (OAPI)

All dokumentasjon som utarbeides om en medisinsplante sammenfattes i et dokument som presenteres for en vitenskapelig komité ved DMT. En vitenskapelig ansatt vil vurdere legemiddelet og gi en uttalelse. Dersom den vitenskapelige komiteen blir enige om at legemiddelet er godt nok, vil DMT søke om autorisasjon fra helseministeren til å produsere og selge det ferdige preparatet. I alt 10 prøver sendes til helseministeren, i tillegg til all dokumentasjon som foreligger. Alt vil så gjennomgås, dokumentene leses igjennom og prøvene testes på laboratoriet.

DMT tar ikke patent på fremstillingsprosessen, kun på sitt varemerke. Dette medfører at ingen andre kan bruke deres navn på produktet, men alle har lov til å lage det samme legemiddelet. Å søke om patent er en meget kostbar prosess. En healer som videreformidler en oppskrift til DMT, vil få rettighetene til analyseresultatene. DMT kan likevel publisere vitenskapelige resultater. Vedkommende med slike rettigheter til det endelige produktet, kan søke om patent på sin oppskrift fra OAPI som er tilknyttet World Intellectual Property Organisation (WIPO). 16 afrikanske land er tilknyttet OAPI, og har gått sammen for å muliggjøre salg av tradisjonelle legemidler over landegrensene. Andre land har derfor rett til å fremstille det samme legemidlet som DMT har opphavet til, såfremt de bruker et annet varemerke. (Diallo og Paulsen, 2000 og Diallo, 2007)

## **7.4. Feltarbeid**

I løpet av mars og april 2007 ble det gjennomført intervjuer med totalt 55 healere i Dioila- (N'Dia Dougountiguila, N'Gouloubougou og Beleco) og Koutiala-området i Mali.

Henholdsvis 38 og 16 healere ble intervjuet i de to områdene. Intervjuene ble gjennomført

på lokale språk, hovedsakelig bambara, og oversatt til engelsk av tolk og intervjuer, Drissa Diallo. Healerene ble spurt om indikasjon for bruk, tilberedning og dosering av følgende planter: *Erythrina senegalensis*, *Opilia celtidifolia*, *Combretum glutinosum*, *Syzygium guineense* og *Biophytum petersianum*. Denne oppgaven vil kun omfatte resultater for sistnevnte plante.

#### 7.4.1. Healerintervjuer i Dioilaområdet

Det ble utført til sammen 38 intervjuer i Dioila-regionen fordelt på tre områder. 35 av de 38 brukte *B. petersianum* i sin praksis. Av praktiske årsaker har jeg valgt å dele Dioila inn i de tre områdene der vi intervjuet. Et intervju ble også gjort i Blendio, og dette er inkludert i tabell med intervjuer fra N'Golobougou. Enkelte indikasjoner er svært like, og det er uklart hvor spesifikke healerne har ment å være eller om det kan dreie seg om liknende tilstander. Eksempelvis kan indikasjoner som nevrologisk malaria, beroligende, krampeløsende og epilepsi nevnes, som jo er forskjellige sykdommer men de kan alle beskrives med krampetilstander i sitt sykdomsbilde.

##### 7.4.1.1. N'Dia Dougountiguila

Resultatene fra healerintervjuer i N'Dia Dougountiguila (Dioilaområdet) er presentert i Tabell 7-1. De fem healerne brukte *B. petersianum* på til sammen seks forskjellige indikasjoner. Hele planten både med og uten rot ble brukt. Pulverisert plante ble forsøkt som afrodisiakum. Ved nevrologisk malaria ble barnet behandlet utvortes, enten vasket med dekokt av planten eller massert inn med pulver i olje. Det var rettet et særlig fokus på hodet. Ved bruk av dekokt skulle barnet også drikke litt, men dette forutsatte bevissthet. Planten ble også brukt på hodeskaller som ikke vokste riktig, da som pulver til applisering i ganen. Pulverisert plante blandet med olje ble også brukt til å smøre på bena til barn som ikke begynte å gå. I dette området var N'yeleni cloutogo det vanligste navnet å bruke.

**Tabell 7-1:** Resultater fra healerintervjuer i N'Dia Dougountiguila

Healers navn og alder	Landsby	Plantens lokalt navn	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Fanto Yaya Diabate, 39 år, president i healerforbundet	N'Dia Dougountiguila	Yeleni nutougo	Skaper vennskap	Ingen medisinsk bruk
Paul Diabate, 62 år	N'Dia Dougountiguila	Yeleni nutougo	Afrodisiakum	Hel plante. Pulver gnis på ferdig tilberedt kjøtt og spises.
			Når et barn ikke vil lære å gå	Bland pulver med olje, gni det på barnets ben.
Michael Diabate, 55 år	N'Dia Dougountiguila	Yeleni N'cloutogo	Nevrologisk malaria Krampeløsende	Hel plante. Pulveriseres og gnis først på barnets hode med, deretter hele kroppen.
Bakari Fomba, 78 år	N'Dia Dougountiguila	Yeleni N'cloutogo	Når hodeskallen ikke vokser godt nok sammen	Hel plante. Pulveriseres og karboniseres, og appliseres på ganen. Gjentas morgen og kveld
Sidiki Djera, ca 50 år	N'Dia Dougountiguila	Yeleni N'cloutogo	Nevrologisk malaria	Hel plante Vasker hele kroppen med dekokt. Drikkes morgen og kveld helt til frisk igjen, noen få dager.

**Figur 7-3:** En "bunt" med plantemateriale som brukes til å lage dekokter (Foto: Austarheim, 2007)

#### 7.4.1.2. Healerintervjuer i Beleco

Resultatene fra healerintervjuene i Beleco er presentert i Tabell 7-2. Av totalt 16 healere brukte alle *B. petersianum* for til sammen 10 forskjellige indikasjoner. De hyppigst nevnte indikasjonene var nevrologisk malaria /profylakse (9), dystussi (3) og schistosomiasis (2). En healer brukte planten både til profylakse og behandling av nevrologisk malaria. Hele planten uten røtter var hyppigst brukt, men å inkludere roten var heller ikke uvanlig. Bare én healer brukte bladene alene. Planten ble oftest brukt i dekokter, men mange healere pulveriserte og blandet planten med olje. Andre igjen lagde en "fumigasjon" av planten som skulle inhaleres. Lokalt navnet som oftest gikk igjen var N'jeni cloutogo.

**Tabell 7-2: Resulater fra healerintervjuer i Beleco**

Healers navn og alder	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Sinali Dambelé, 57 år	Koloco, 8 km fra Beleco	Jutuguni	Dystussi  Mot hodepine	Blader blandes med vann. Drikkes av den gravide, barnet vil snu seg Lager ”fumigasjon”, røyken inhaleres
Somana Sanghare, 45 år	Blendibougoua	Jutuguni	Forebygge mot nevrologisk malaria	Lager dekokt av plante uten rot og vasker babyen med dette 3. levedag.
Clement Coulibali, 49 år	Diannasoba	N’jeni	Mot sterilitet hos kvinner	Lager et pulver av hel plante som blandes med vann og drikkes
Victor Damele, 67 år	Guguina Bavana	N’jeni cloutogo	Mot otitt	Lag dekokt av hele planten og appliser noen få dråper i ørene. Gjentas et par ganger, fortsetter til det er bra
Viangoro Sangaré, 57 år	Filala Damine	N’jeni cloutogo	Mot muskel/nerveproblemer hos barn, når de har vanskeligheter med å gå.	Lager dekokt av hele planten og vasker bena
Ibrahim Sangaré, 60 år	Fangadougoudjola	Djutogoni	Mot nevrologisk malaria	Legg plante uten rot i vann, babyen vaskes med dette vannet, drikker også litt
André Dambele, 38 år	Niangoula, 12 km unna	N’jen cloutogo	For rett posisjon av baby ved fødsel	Lag pulver av hele planten, blandes med olje og appliseres på magen i nedovergående bevegelser
Domatje Sangare, 43 år	Filala Damenje	N’jeni cloutougou	Mot nevrologisk malaria  Mot schistosomiasis  Forebygge mot nevrologisk malaria hos baby/gravide Krampeløsende	Hastebehandling, ved krampes: Ferdig tilberedt blandes med vann i hånden og påføres barnets hode. Etter krampene blandes pulveret med vann og barnet drikker det.  Drikker dekokt 1 gang daglig, ca 1 teglass. Håndfull mengde plante kokes i tekopp vanligvis fra 6 år og oppover  Vasker den gravide kvinnen med vann blandet med pulver  Lage ”fumigasjon” som kommer på babyen når den har krampes, barn på fanget, røyk under
Alouss Sangare, 56 år	Laindibougola	N’jeni cloutougou	Schistosomiasis	En håndfull tørket plante uten røtter i en tekopp med vann. Lager dekokt som drikkes daglig i 1 uke
Jacoba Foni, ca 70 år	N-Guolokona	Dutogoni	Nevrologisk malaria	Plante uten røtter blandes med blader fra <i>Vitex doniana</i> . Dekokt drikkes og baby vaskes.
Zambile Dambele, 80 år	Njonguila	N’jene cloutougou	Dystussi	Hele planten pulveriseres, og masseres inn på den gravide dames mage
Korotomo Famba,	Korala	N’jeni	Nevrologisk malaria	Finpulverisert plante uten

53 år (kvinne)		cloutougou		røtter. Appliser litt i nesebor og abdomen påsmøres først, deretter hodet og tilslutt resten av kroppen
Masima Fomba, 42 år	Boukourala	Kono	Nevrologisk malaria	Hele planten knuses, tilsett vann. Blandingen filtreres og litt av filtratet dryppes i nesebor, i tillegg til vask av hele kroppen
Sela-Souba	Salefo	N'jileni clotogo	Magesmerter	1x3 fingre pulver fra plante. Blandes med et teglass med vann. Drikkes
Alo Fomba, 59 år (visepresident)	Falani	Djutogoni	Nevrologisk malaria	Brukes sammen med <i>Hieria insignis</i> . Knuses sammen og lager fumigation. Blandes med olje og blandes med varmt vann. Smøres hhv på kroppen og drikkes
Aruna Fane, 53 år	Ongobokona	Djutogoni	Nevrologisk malaria	Lager en "fumigasjon" som blandes med olje
			Beroligende	Lager dekokt av en ½ bunt med plante

#### 7.4.1.3. Healerintervjuer i N'Golobougou

Resultatene fra healerintervjuene i N'Golobougou er presentert i Tabell 7-3. Av totalt 16 healere brukte 13 *B. petersianum* for til sammen 9 forskjellige indikasjoner. De hyppigst nevnte indikasjonene var hemorroider (6), nevrologisk malaria (3) og otitt (2). Det var vanligst å bruke hele planten med roten, kun én healer brukte blader i sin praksis, og da som afrodisiakum. Planten ble oftest brukt i dekokt, men i mange tilfeller pulverisert og evt blandet i litt olje. Karbonisering av planten eller bruk i maserasjoner var heller ikke uvanlig. Djutogoni ble hyppigst nevnt som lokalnavn.



**Figur 7-4:** Feltarbeid i N'Golobougou (Foto: Hedding, 2007)

**Tabell 7-3:** Resultater fra healerintervjuer i N'Golobougou

Healers navn, alder og dialekt	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
M'Pie Mariko, 48 år	Digneoro Sokorola	N'yeni cloutogo	Otitt	Lag dekokt eller maserasjon av fersk eller tørket plante og ha noen dråper i hvert øre hver dag i en uke
Yusuf Kolubali, 46 år	N'Golobougou	Djutogoni	Bronkitt	Bland 1x2 fingre pulverisert plante med litt olje og smør litt i neseborene før sengetid.
Saidou Traore, 53 år	S'Kaja	Djutogoni	Dystussi	Karbonisert plante blandes med olje og smøres på den gravide magen.
			Hemorroider	Karbonisert pulver blandes med olje og påføres rektum.
Diakadidia Mariko, 57 år	Morila	Djutogoni	Otitt	Tørr eller fersk plante pulveriseres. Lag en maserasjon med vann. Et par dråper i ørene.
			Nevrologisk malaria	Lag dekokt og vask kroppen
Djamanjara Diarra, 65 år	S'Kaja	N'jene djutogono	Afrodisium	Lag dekokt av bladene og drikk et tekopp daglig
			Svakt syn	Vask øynene med dekokt av planten
Sida Tigi, 90 år	N'Golobougou	Nijani djutogo	Nevrologisk malaria Epilepsi	Plante karboniseres, lager maserasjon og vask babyens kroppen. Lager "fumigasjon" også
Bamara Sangare, 75 år	N'Golobougou	Djutogoni	Afrodisium	Lag pulver av planten og tilsett litt salt. Spises og lages røkelse av
Jacuba Traore, 65 år	N'Golobougou	Djutogoni	Beroligende	Når babyen er redd og har kramper, lages dekokt til å vaske kroppen. Vaskes 2 ganger daglig.
			Hemorroider	Karboniserer planten og skilpaddehode. Påfør pulver i rectum.
Mamadou Jerasuva, 54 år	N'Golobougou	Djutogoni	Hemorroider	Pulveret karboniseres og blander dette med olje, påføres rektum
Bentou Diarrasouba, 45 år (k)	N'Golobougou	Djutogone	Hemorroider	Fersk plante varmes opp litt og påføres sårene i rektum daglig i 14 dager
Chinata Sangare, 55 år (k)	N'Golobougou	Djutogono	Hemorroider	Dekokt av plante drikket eller lager klyster
Kadiatou Sudole, 45 år (k)	N'Golobougou	Djutogono	Hemorroider	Drikket et teglass med dekokt daglig til bedring. Lag pulver som påføres rektum, jevnlig.
Maba Diarra, 80 år (k)	Blendio	Djutogoni	Nevrologisk malaria	Bland pulver med vann som påføres hele kroppen, men særlig hodet, eller Karboniser planten og bland det med olje, påføres kroppen



## 7.4.1.4. Healerintervjuer i Koutiala

Resultatene fra healerintervjuene i Koutiala er presentert i Tabell 7-4. Av totalt 17 healere brukte 15 *B. petersianum* for til sammen 13 forskjellige indikasjoner. De hyppigst nevnte indikasjonene var nevrologisk malaria (3), vennskap og lykke (3), resten av indikasjonene ble nevnt én gang. Hele planten med og uten rot ble brukt. Planten ble oftest brukt i dekokter, men pulverisering og ”fumigasjon” ble også hyppig nevnt. Lokalnavnet Djutogoni ble oftest brukt.

**Tabell 7-4:** Resultater fra healerintervjuer i Koutiala

Healers navn, alder og dialekt	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Moussa Diarra, 60 år	Koutiala	Djutogoni	Sykdommer uten kjent indikasjon (psykiske lidelser)	”Fumigasjon” av 1x3 fingre med pulver av plante uten rot.
			Vennskap	
Seydan Dambere, 66 år	Koutiala	Djutogoni	Samhold i familien	Ved kranling lages pulver som blandes i maten til alle i familien.
Amadou Kafine, 59 år	Koutiala	Djutogoni	Meningitt og kramper	Dekokt av plante lages og 2 dråper i hvert nesebor morgen, 2 dråper i hvert øre om kvelden.
			Elektrisk støt	Dekokt påføres hele kroppen
Adama Doumbia, 50 år	Koutiala	Jutugoni	Nevrologisk malaria	Ved kramper pulveriseres plante og blandes med bark av palmetre. Pulver blandes med olje og påføres hele kroppen.
Yamadou Traore, 53 år	Koutiala	Djutogoni	Indre sår	Pulveriser plante og bland en teskje i grøten som drikkes morgen og kveld.
			Dysmenoré	Dekokt av plante, 1 teglass drikkes morgen og kveld
Abdorelaye Bouave, 57 år	Koutiala	Djutogoni	Mot sterilitet hos kvinner	1 teglass dekokt av plante og blader fra <i>Guiera senegalensis</i> drikkes morgen, ettermiddag, 2 teglass før sengetid. Tilsett sitron eller tamarind.
Alassana Barazi, 44 år	Koutiala	Djutogoni	Lykke	Pulveriser plante og lag røkelse. Blandes med vann og påføres kroppen morgen og kveld.
Mama Tangara, 54 år	Fra M’Bela men bor i Koutiala	Djutogoni	Nevrologisk malaria	Dekokt av plante uten rot og bland med <i>Scoparia Dulcis</i> . Vasker baby med dette, og drikkes. Lag ”fumigasjon” av planten også.
Kalij Bagayoko, 58 år	Fra Kita, men bor i Koutiala	Jutugoni	Nevrologisk malaria	Lag ”fumigasjon” av pulver og pottaske (KOH). Påføres hele kroppen. Barnet drikker også litt av pulver blandet med saft fra 2 sitroner.

Yusuf Diarra, 67 år	Fra Djena, men bor i Koutiala	Djutogoni	Dystussi	Lag dekokt og drikk små mengder
Samba Diarra, 63 år	Koutiala	Djutogoni	Hemorroider	Pulver blandes 1:1 med sopp-pulver og påføres rektum
Salia Djabaté, 81 år	Signe Koduguni	Koduguni	Nevrologisk malaria	Baby vaskes med dekokt av plante. Drikk også større mengder av dekoktet.
Birama Djabaté, 65 år	Signe Koduguni	Djutogoni	Amenoré	Dekokt av plante og bark fra <i>Khaya Senegalensis</i> , drikk ett teglass. Vil begynne å blø samme dag.
Yusuf Djabaté, 55 år	Signe Koduguni	Djutogoni	Kraftig og vedvarende menstruasjon	Teglass av dekokt av plante drikkes 2 ganger daglig.
Mamoudou Sanogo, 44 år	N'Tiesso	Djutogoni	Amenoré Magesår	Vask kjønnsorgan med dekokt 1x3 fingre av pulverisert plante blandet med <i>Piliostigma reticulatum</i> (frukten) spises 3 ganger daglig i en uke

#### 7.4.1.5. Forklaringer til tabellene

Teglass	Glass nr 8 (verre 8), rommer ca 75 ml.
Dekokt	Plantematerialet varmes på flamme i en leirvase (canari) i en mengde vann i en gitt tid.
1x antall fingre	Mål for pulverisert plantemateriale. Indikerer antall fingre brukt som en "klype".
(k)	Kvinnelig healer.
Fumigasjon	Planten ble bragt over ild og røyk eller damp inhaleres.
Maserasjon	Plante blandet med kaldt vann.
Karbonisert	Brent plantemateriale.
Dystussi	Betegnelse på foster som ligger med hodet i gal retning.

#### 7.4.1.6. Oppsummering av resultater fra healerintervjuer

Av de 55 healerne som ble intervjuet i Dioila og i Koutiala var det totalt 49 som brukte *B. petersianum* i sin praksis. Det ble oppgitt tilsammen 24 indikasjoner, og hele 17 av 49 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. I tillegg ble planten brukt som krampeløsende av ytterligere to healere. Per idag er det ikke gjort studier på om *B. petersianum* har en slik effekt. Det ville vært interessant å studere dette nærmere.

Flere healere brukte *B. petersianum* mot hemorroider. I N'Golobougou brukte 6 av 13 healere planten mot dette. 4 av de 6 healerne var kvinner. Indikasjonen hadde ikke tilsvarende utbredelse i de andre landsbyene. Andre indikasjoner som ble nevnt flere ganger, var dystussi (5 healere), amenoré og dysmenoré. I tillegg ble planten ikke sjelden brukt som en "vennskapsplante", noe som mest sannsynlig kan tilskrives signaturlæren.

Dekokt av hele planten med eller uten røtter var den hyppigst oppgitte tilberedningsformen. Det skulle enten drikkes eller pasienten skulle vaskes med dekoktet. Pulverisert plante evt blandet med olje ble ofte brukt til påsmøring på kroppen. Det var heller ikke uvanlig å lage røyk eller damp som skulle inhaleres av pasienten ("fumigasjon").

## 8. Konklusjon

Målet i denne oppgaven var todelt. Studiene utført av Inngjerdingen i perioden 2002-2006 skulle videreføres. Polysakkarider fra *B. petersianum* skulle isoleres og undersøkes med hensyn til karbohydratinnhold og struktur. Videre skulle det legges særlig vekt på å studere immunmodulerende aktivitet og struktur – aktivitetsforhold i biologiske systemer. Så skulle det gjennomføres etnofarmakologiske studier i Mali bestående av healerintervjuer.

Sure pektinske polysakkarider isolert fra vandig ekstrakt av *B. petersianum* viser immunmodulerende aktivitet. Råekstrakt isolert etter ionebytting viste fem ganger høyere antikomplementær effekt enn den positive kontrollen PM II. Etter videre opprensning og fraksjonering ble bl.a BPII1-I isolert, som viste over 16 ganger høyere aktivitet enn PMII.

Analyse av karbohydratinnhold og bindingsforhold viste innhold av vanlige pektinstrukturer som RGI og AGII og HG-områder. Ikke like vanlig er tilstedeværelsen av GalA-forgreningspunkter og XylpT. Bindingsforholdet korrelerer godt, noe som tyder på en større forekomst av XG. I tillegg forekommer det store og komplekse hårete områder bestående av RG-hovedkjeder med AG II-sidekjeder av nøytrale Gal- og Ara-enheter. Alle fraksjonene isolert etter gelfiltrering på Superdex 200 viste høyt innhold av terminale bindinger som kan bety høy grad av forgrening. BPII1-I hadde en større grad av dette enn BPII1-II og BPII1-III.

ICH<sub>50</sub>-verdien til BPII1-I varierte over tohundrefold ved bruk av det mest sensitive komplementserumet i forhold til det minst sensitive serumet. Verdiene for BPII1-I korrelerer godt med de resultater PM II som ble presentert av Michaelsen *et al.* (2000), men PM II viser en lavere ratio-variasjon (PMII/ $\Delta$ IgG) enn for BPII1-I (BPII1-I/ $\Delta$ IgG). Dette kan komme av tilfeldigheter pga variasjoner under komplementtestens forhold. En annen mulig årsak er at BPII1-I utøver sin komplementfikserende aktivitet gjennom andre reaksjonsmekanismer enn PM II.

En modifikasjon av komplementfikseringstesten som kan skille mellom komplementaktivering og komplementinhibisjon viste at BPII1-I virker komplementaktiverende på en tilsvarende måte som PM II.

Analyse av bindingsforholdene til den enzymatisk degraderte fraksjonen BPII1-IIIE viste færre AraTf enn BPII1-II, men endringen i bindingsforholdene ga ubetydelig forskjell for BPII1-IIIs komplementfikserende aktivitet. Den enzymatisk degraderte BPII1-IIIE inneholdt langt færre bindinger med forgreningspunkter. AraTf og Gal var ikke lenger tilstede, men noe 1,4,5-Ara var fortsatt tilstede. Det kan komme av at enzymet ikke har kommet i god nok kontakt med substratet pga høy grad av forgrening. Måling av antikomplementær aktivitet viste en reduksjon av aktivitet for BPII1-IIIE i forhold til BPII1-III, men fraksjonen var fortsatt like aktiv som PM II. Fjerning av Ara- og Gal-bindinger har trolig redusert mengde AGII og forgrening i RGI. Forgorening har vist å være viktig for aktivitet ettersom dette kan gi flere bindingssteder på molekylet.

Alle fraksjonene unntatt BPII1-IV og BPII1-V viste en økt utskillelse av NO fra makrofager. Responsen var doseavhengig og kan tyde på makrofagstimulerende egenskaper. Dette stemmer overens med tidligere funn av Inngjerdingen (2002-2006).

Av de 55 healere i Dioila- og Koutiala-området brukte 49 *B. petersianum* i sin praksis. Av 24 indikasjoner for bruk var nevrologisk malaria, hemorroider og dystussi hyppigst nevnt. 17 av 49 healere brukte planten mot nevrologisk malaria. Plante uten rot var hyppigst i bruk, og da særlig som et dekokt

## 9. Referanser

Alban, S., Classen, B., Brunner, G., Blaschek, W. Differentiation Between the Complement Modulating Effects of an Arabinogalactan-Protein from *Echinacea purpurea* and Heparin. *Planta Medica*. 68, **2002**, 1118-1124

AmershamPharmaciaBiotech, PD-10 Desalting columns. Instruksjonshefte.

AmershamPharmaciaBiotech, Superdex 200 HR 10/30. Instruksjonshefte.

AmershamPharmaciaBiotech, Superose 6 HR 10/30. Instruksjonshefte.

Aslaksen, T.H. Muntlig meddelelse, **2007**

Austarheim, I., foto. Mars/april **2007**

BioRadLaboratories, Bio-Gel P Polyacrylamide Gel. Instruksjonshefte.

Botanic, foto. [www.botanic.jp/plants-aa/osafuu\\_2.jpg](http://www.botanic.jp/plants-aa/osafuu_2.jpg) (**10.11.07**)

Bruneton, J., Carbohydrates. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*, Intercept: London. 2, **1999**, 33-35.

Bucar, F., Jachak, S.M., Noreen, Y., *et al.* Amentoflavone from *Biophytum sensitivum* and its effects on COX-1/COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Medica*. 64, **1998**, 373-374

Burkhill, H. M. *The Useful Plants of West Tropical Africa*. 2. opplag. Royal Botanical Gardens KEW, Surrey. 4, **1997**, 336-338.

Cambridge University Press **2003**, foto. [www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig001ktl.gif](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig001ktl.gif) (**10.11.07**)

Chambers, R.R.E. og Clamp, J.J.R. An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal*. 125, **1971**, 1009–1018.

CIA. The World Factbook- Mali. <https://cia.gov/cia/library/publications/factbook/the-world-factbook/print/ml.html> (**06.11.07**)

Ciucanu, I. og Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131, **1984**, 209-217.

Cox, P. og Balick, M. The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*. 6, **1994**, 82-87.

Diallo, D., foto. Feltarbeid, **2007**.

Diallo, D. Muntlig meddelelse **07.04.07**. Koutiala, Mali

Diallo, D. og Paulsen, B. Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. *Responding to bioprospecting : from biodiversity in the south to medicines in the north*, Svarstad, H.; Dhillon, S. S., Eds. Spartacus: Oslo, **2000**, 133-144.

Diallo, D. Sogn, C. Samaké, F.B., Paulsen, B.S. Michaelsen, T.E. Keita, A. Wound healing plants in Mali, Bamako region. An ethnobotanical survey and complement fixation of water extracts from selected plants. *Pharmaceuticals Biology*. 40, **2002**, 117-128.

Farnsworth, N.R. Amazonian ethnobotany and the search for new drugs. *Ethnobotany and the search for new drugs*, Chadwick, D. J., Marsh, J. Eds. Wiley: Chichester. **1994**, 42-59.

Flora of Zimbabwe, foto.

[www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species\\_id=132860](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=132860) (**05.11.07**)

Florence, A.T. og Atwood, D. *Physiochemical Principles of Pharmacy*. 3, **1998**, 308-371

Gordon, S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell*. 111, **2002**, 927-930.

Greibrokk, T., E. Lundanes og K.E. Rasmussen, Red. *Kromatografi*. Universitetsforlaget, **1998**.

Guo, R.F. og Ward, P. Role of C5a in inflammatory responses. *Immunology*. 23, **2005**, 821-852

Hedding, B., foto. Mars/april **2007**

Heinrich, M. og Gibbons, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, **2001**, 425-432.

Hokputsa, S., Gerddit, W., Pongsamart, *et al.* Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. *Carbohydrate Polymers*. 56, **2004**, 471-481.

Hokputsa, S., Harding, S.E., Inngjerdingen, K., *et al.* Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. *Carbohydrate Research*. 339, **2004**, 753-762.

Inngjerdingen, K.T. Bioactive pectic polymers from Malian medicinal plants. *Doktoravhandling*, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, **2007**

Inngjerdingen, K.T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. A Complement Fixing Polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a Medicinal plant from Mali, West Africa. *Biomacromolecules*. 7, **2006**, 48-53.

Inngjerdingen, K.T. Sårhelende planter i Mali, A: Videre studier over *Glinus oppositifolius*. B: Feltarbeid i Dogonland og Sikasso. *Hovedfagsoppgave i farmakognosi*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, **2000**.

Jachak, S. M., Bucar, F., Kartnig, T. Antiinflammatory activity of extracts of *Biophytum sensitivum* in carrageenin-induced rat paw oedema. *Phytotherapy research*. 13, **1999**, 73-74.

Kim, J. og Carpita, N. Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology*. 98, **1992**, 646-653.

Kiyohara, H., Yongwen, Z. og Yamada, H. Effect of exo-d-(1 →3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Polymers*. 32(3), **1997**, 249-253.



- Kodjo, K.M. Contesse, V., Do Rego, J.L., *et al.* In vitro effects of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae), *Stereospermum kunthianum* (Bignoniaceae), and *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) on corticosteroid secretion in rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 100, **2006**, 202-208.
- Martin, P., Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276, **1997**, 75-81.
- Merck, foto. [www.merck.com/media/mmpe/figures/MMPE\\_13IMM\\_163\\_02\\_eps.gif](http://www.merck.com/media/mmpe/figures/MMPE_13IMM_163_02_eps.gif) (**02.11.07**)
- Michaelson, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Hogasen, K., Paulsen, B.S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*. 52, **2000**, 483-490.
- Nationmaster, Maps of Mali. [http://images/motw/africa/mali\\_rel94.jpg](http://images/motw/africa/mali_rel94.jpg) (**06.11.07**)
- Nations online, [http://www.nationsonline.org/map\\_small/mali\\_small\\_map.jpg](http://www.nationsonline.org/map_small/mali_small_map.jpg) (**22.11.07**)
- Nergård, C. S. Immunomodulating Pectic Polymers, A: An Ethnopharmacological Survey of Wound Healing Plants used in Mali, West-Africa, B: Structures and Immunological Studies of Polysaccharides from Wound Healing Plants. *Doktoravhandling*, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, **2005**.
- Nergård, C.S., Kiyohara, H.; Reynolds, J., *et al.* Structures and structure-activity relationships of three mitogenic and complement fixing pectic arabinogalactans from the malian antiulcer plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Biomacromolecules*. 7, **2006**, 71-79.
- Nergård, C. S.; Matsumoto, T.; Inngjerdengen, M., *et al.* Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydrate Research*. 340, **2005**, 340, 115-130.
- NUFU, **2007**: [http://www.uio.no/english/about\\_uio/international/north-south/nufu/afrika/malime.html](http://www.uio.no/english/about_uio/international/north-south/nufu/afrika/malime.html) (**06.11.07**)

Paoletti, C., Kasper, D.L., Michon, F., *et al.* Effects of Chain Length on the Immunogenicity in Rabbits of Group B Streptococcus Type III Oligosaccharide-Tetanus Toxoid Conjugates. *Journal of Clinical Investigation*. 89, **1992**, 203-209.

Parham, P. The immune system, **2005**. Garland Science Publishing

Paulsen, B.S., Barsett, H. Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science*. 186, **2005**, 69-101.

Paulsen, B.S. Immunmodulerende stoffer fra planter. *Forelesningsnotater hovedfag*, **19.04.07**

Paulsen, B.S. Polysakkarider. *Forelesning i farmakognosi PBB 281* (**31.08.05**).

Promega Corporation, Griess Reagent System. I Technical Bulletin *INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930*, Promega Corporation: Madison, WI, **2005**.

Puri, D. The insulintropic activity of a Nepalese medicinal plant *Biophytum sensitivum*: preliminary experimental study. *Journal of Ethnopharmacology*. 78, **2001**, 89-93.

Reid, J.S.G. Carbohydrate Metabolism: Structural carbohydrates. *Plant Biochemistry* Eds, Dey, P.M., og Harborne, J.B. Academic Press, Inc. **1997**, 205-235.

Rusten, Anders. Struktur og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra *Syzygium guinense*, Etnofarmakologiske studier i Mali. *Hovedfagsoppgave i farmakognosi*, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, **2006**, 36.

Samuelsen, A.B., Paulsen, B.S., Wold, J.K., *et al.* Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers*. 30, **1996**, 37-44.

Schepetkin, I.A. og Quinn, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 6, **2006**, 317-333.

Smith, M.C., Pensky, J. og Naff, G. B. Inhibition of Zymosan-Induced Alternative Complement Pathway Activation by Concanavalin A. *Infection and immunity*. 38, **1982**, 1279-1284.

Stephen, A.M., Other Plant Polysaccharides. *The Polysaccharides*, Aspinall, G. O., Ed. Academic Press: New York. 3, **1982**, 124-132.

Sturgeon, R.J. Monosaccharides. *Methods in Plant Biochemistry*. 2, **1990**, 1-37.

Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society*. 85, **1963**, 2497-2507.

Taiz, L. og Zeiger, E., Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. I *Plant Physiology*, Sinauer Associates: Sunderland. 2, **1998**, 409-424.

The International Plant Names Index (IPNI), **2007**;  
[http://www.ipni.org/ipni/plantNameByVersion.do?id=371960-1&version=1.1&show\\_history=true&back\\_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind\\_wholeName%3Dbiophytum%2Bpetersianum%26output\\_format%3Dnormal](http://www.ipni.org/ipni/plantNameByVersion.do?id=371960-1&version=1.1&show_history=true&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Dbiophytum%2Bpetersianum%26output_format%3Dnormal) (**10.11.07**)

Tzianabos, A.O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clinical Microbiology Reviews*. **2000**, 523-533.

United-Nations-Development-Program. Country Fact Sheets - Mali.  
[http://hdr.undp.org/statistics/data/country\\_fact\\_sheets/cty\\_fs\\_MLI.html](http://hdr.undp.org/statistics/data/country_fact_sheets/cty_fs_MLI.html) (**06.11.07**)

University of East Anglia, foto. [www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster06/fig1alp.gif](http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster06/fig1alp.gif) (**02.11.07**)

Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., *et al.* If homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*. 132, **2003**, 1781-1789.

Von Hunolstein, C., Parisi, L., Bottaro, D. Simple and rapid technique for monitoring the quality of meningococcal polysaccharides by high performance size-exclusion chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 56, **2003**, 291-296.

Voragen, A.G.J., Daas, P.J.H. og Schols, H.A. Enzymes as tools for structural studies of pectins. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Bioactive *Carbohydrate Polymers*. 44, **2000**, 129-145.

w3 TROPICOS, **2007**; [http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search\\_vast](http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast) (**10.11.07**)

Wagner, H., Kraus, S., og Jurcic, K. Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources. *Immunomodulatory Agents from Plants*. **1999**, 1-39.

Willats, W.G.T., Mc Cartney, L., Mackie, W., Knox, J.P. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47, **2001**, 9-27

Xu, H., Zhang, Y., Zhang, J. og Chen, D. Isolation and characterisation of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. *International Immunopharmacology*. 7, **2007**, 175-182.

Yamada, H., Nagai, T., Cyong, J.C., *et al.* Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, *Plantago-mucilage* A, from the seed of *Plantago asiatica*. *Carbohydrate Research*. 156, **1986**, 137-145.

Yamada, H. og Kiyohara, H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. *Immunomodulatory Agents from Plants*. Ed, Wagner, H. Basel. **1999**, 161-202.

Yamada, H.og Kiyohara H. Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures. *Comprehensive Glycoscience, From Chemistry to Systems Biology*, Elsevier. **2007**, 664-668.